



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη και αξιολόγηση γηγενών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*

Φοιτητές:

Γράμψας Αθανάσιος (ΑΜ:161017)

Παπαχρήστου Γεώργιος (ΑΜ:161084)

**Επιβλέπων/-ούσα Ονοματεπώνυμο: Επίκουρη Καθηγήτρια Δημοπούλου
Μαρία**

ΑΘΗΝΑ-ΙΟΥΛΙΟΣ-2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

BACHELOR THESIS

Study and evaluation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains

Students:

Grampsas Athanasios (RN:161017)

Papachristou Georgios (RN:161084)

Supervisor name and surname: Assistant Professor Dimopoulou Maria

ATHENS – JULY - 2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ**

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:
«μελέτη και αξιολόγηση γηγενών στελεχών *saccharomyces cerevisiae*» και
βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι: Γράμψας Αθανάσιος του Χρήστου και Παπαχρήστου Γεώργιος του Δημητρίου, με αριθμούς μητρώου 161017 και 161084 αντίστοιχα, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής επιστημών τροφίμων, του Τμήματος Επιστημών οίνου αμπέλου και ποτών, δηλώνουν υπεύθυνα ότι:

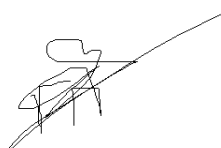
«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

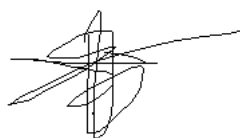
Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι

..... και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Οι Δηλούντες



Παπαχρήστου
Γεώργιος



Γράμψας
Αθανάσιος

*Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή: Δημοπούλου Μαρία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση γηγενών στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, ως προς το οινολογικό τους δυναμικό για την παραγωγή οίνων της ποικιλίας Ασύρτικο. Οι εξεταζόμενες ζύμες έχουν απομονωθεί από αυθόρμητες ζυμώσεις διαφορετικών περιοχών και ποικιλιών. Αρχικά τα 20 στελέχη αξιολογήθηκαν μέσω μικρό-οινοποιήσεων εργαστηριακής κλίμακας σε παστεριωμένο γλεύκος Ασύρτικου, ως προς την ζυμωτική τους ικανότητα και τον αρωματικό τους χαρακτήρα. Στην συνέχεια, επιλέχθηκαν τα στελέχη με το μεγαλύτερο οινολογικό ενδιαφέρον και εμβολιάστηκαν εκ νέου σε ζυμώσεις μεγαλύτερης εργαστηριακής κλίμακας σε παστεριωμένο γλεύκος της ποικιλίας Ασύρτικο. Στις ζυμώσεις αυτές, αξιολογήθηκε η ζυμωτική ικανότητα των στελεχών, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων και πραγματοποιήθηκαν και χημικές αναλύσεις των δειγμάτων, σύμφωνα με τα επίσημα πρωτόκολλα του ΟΙV, πριν και μετά την αλκοολική ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, οι αναλύσεις των οίνων αφορούσαν την ολική οξύτητα, το παραγόμενο διοξείδιο του θείου (SO₂) στην ελεύθερη και ολική μορφή του, το pH, το αφομοιώσιμο άζωτο, την παραγωγή οξικού οξέος και την περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Τέλος μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη στατιστική επεξεργασία αυτών, πραγματοποιήθηκε επιλογή του στελέχους που απέδωσε βέλτιστα στα ζητούμενα του πειράματος.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ασύρτικο , *Saccharomyces cerevisiae* , αλκοολική ζύμωση, κινητική ζυμώσεων, αρωματικό προφίλ, γηγενείς ζύμες

ABSTRACT

The present thesis focuses on the evaluation of indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* species, over their oenological dynamic for the production of wines from variety Assyrtiko. The examined yeasts have been isolated from indigenous fermentations from different regions and varieties. First of all, the 20 strains have been evaluated due to micro-vinification in vitro to pasteurized must of Assyrtiko, over their fermentation capability and their aromatic character. Afterwards, the strains with the biggest oenological interest have been chosen and inoculated afresh in bigger fermentation in vitro to pasteurized must of Assyrtiko. In these fermentations, the fermentation capability of the strains and the organoleptic characteristics of the produced wines have been evaluated and chemical analysis of the samples has taken place, accommodate to formal protocols of OIV, before and after the alcoholic fermentation. More specific, the analysis of wines refers to total acidity, the produced sulfur dioxide (SO₂) in free and total form, the pH, the assimilated Nitrogen, the production of acetic acid and the comprehensiveness of ethanol. Last but not least, after the evaluation of the results and the statistical process of them, the choice of the strain that performed best in the requests of the experiment has taken place.

KEY WORDS: Assyrtiko, *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation, fermentation kinetic, aromatic profile, indigenous yeasts.

Πίνακας περιεχομένων

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Γλεύκος.....	10
1.2. Οίνος.....	11
1.3. Βασικά στάδια οινοποίησης	11
1.4. Αλκοολική ζύμωση.....	13
1.5. Βασικές οινολογικές αναλύσεις.....	14
1.5.1. Σάκχαρα.....	14
1.5.2. Οργανικά οξέα στο κρασί.....	14
1.5.3. Διοξείδιο του θείου (SO ₂).....	15
1.5.4. Αιθυλική αλκοόλη.....	17
1.5.5. Αφομοιώσιμο άζωτο	18
1.5.6. Οξικό οξύ.....	18
1.6. Ασύρτικο	19
2. Ζύμες	20
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.2. Εμπορικές και γηγενείς ζύμες.....	21
2.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες	22
2.4. Άρωμα οίνου	24
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	26
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
4.1. Προέλευση στελεχών <i>S. cerevisiae</i>	27
4.2. Μικρό-οινοποιήσεις πολύ μικρού όγκου (50 mL).....	28
4.2.1. Μέτρηση κατανάλωσης σακχάρων (γλυκόζη-φρουκτόζη)	29
4.3. Μικρό-οινοποιήσεις μικρού όγκου (1L)	31
4.3.1. Μέτρηση κατανάλωσης ολικών σακχάρων.....	31
4.3.2. Διοξείδιο του θείου	32
4.3.3. Αφομοιώσιμο Άζωτο.....	33
4.3.4. Αιθυλική Αλκοόλη.....	34
4.3.5. Ολική οξύτητα	34
4.3.6. Οξικό Οξύ.....	35
4.3.7. Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	35

5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
5.1.	Μικρο-οινοποιήσεις 20 γηγενών στελεχών <i>S. cerevisiae</i>	36
5.2.	Μικρο-οινοποιήσεις επιλεγμένων στελεχών <i>S. cerevisiae</i>	39
5.2.1.	Μέτρηση κατανάλωσης ολικών σακχάρων	39
4.2.2	Αποτελέσματα βασικών οινολογικών αναλύσεων	41
4.2.3.	Αποτελέσματα ανάλυσης αρωματικού προφίλ	44
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	48
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49
6.2.	Ξένη βιβλιογραφία.....	49
6.3.	Ελληνική Βιβλιογραφία	52

Κατάλογος Εικόνων:

Εικόνα 1: Στάδια λευκής Οινοποίησης.

Εικόνα 2 : Πεχάμετρο. Εργαστηριακό όργανο που μετράει το pH.

Εικόνα 3: Περιοχές και απομονώσεις ζυμών που πραγματοποιήθηκαν.

Εικόνα 4 : Αναλυτής Hyperlab όπου πραγματοποιήθηκαν οι τελικές μετρήσεις σακχάρων των στελεχών.

Κατάλογος Διαγραμμάτων:

Διάγραμμα 1: Καμπύλες κατανάλωσης α) D-Γλυκόζης και β) D- Φρουκτόζης από τα στελέχη ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* που εξετάστηκαν. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Διάγραμμα 2 : Καμπύλες κατανάλωσης ολικών σακχάρων από τα στελέχη ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* που εξετάστηκαν. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Διάγραμμα 3 : Συνολικό αρωματικό προφίλ των τεσσάρων στελεχών.

Διάγραμμα 4: Κατάταξη αρεσκείας των στελεχών από τους δοκιμαστές.

Κατάλογος Πινάκων:

Πίνακας 1: Στελέχη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν ανά περιοχή και ποικιλία

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις D-γλυκόζης και D-φρουκτόζης στον μούστο και στο τελικό σημείο της ζύμωσης (214h).

Πίνακας 3: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των τεσσάρων στελεχών. Οι τιμές αναφέρονται σε g/L, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους.

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα των οινολογικών αναλύσεων στους παραγόμενους οίνους με χρήση των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae* και μη *S. cerevisiae*. Κάθε ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και αναφέρεται η μέση τιμή των αναλύσεων \pm τυπική απόκλιση.

Πίνακας 5: Σύγκριση απόδοσης σε αιθανόλη από τα στελέχη που εξετάστηκαν

Πίνακας 6: Στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρωμάτων των στελεχών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραγωγή του κρασιού φαίνεται να ξεκίνησε το 7.000 με 5.000 π.Χ. σύμφωνα με αρχαιολογικές έρευνες και πιο συγκεκριμένα, τα παλαιότερα κατάλοιπα οινοποίησης βρέθηκαν σε περιοχή νότια της Τιφλίδας, πρωτεύουσα της Γεωργίας και χρονολογούνται ανάμεσα σε αυτή την χρονική περίοδο. Ο αρχαιολόγος του University of Pennsylvania, Patrick McGover ανακάλυψε σε πήλινα βάζα υπολείμματα τρυγικού οξέος, από την περιοχή της Μεσοποταμίας το 5.000 π.Χ. και στη συνέχεια μεταδόθηκε προς την Αίγυπτο. Για πολλά χρόνια οι ζυμώσεις του γλεύκους πραγματοποιούνταν από αυτόχθονες ζύμες οι οποίες είτε υπήρχαν στην φλούδα του σταφυλιού είτε στο περιβάλλον της οινοποίησης. Κατά το δεύτερο μισό του 19 αιώνα ο Pasteur ανακάλυψε ότι η αλκοολική ζύμωση είναι αποτέλεσμα της δράσης των ζυμών και λίγο αργότερα το 1890 ο Müller-Thurgau εισηγήθηκε την εκκίνηση των ζυμώσεων με την χρήση επιλεγμένων και καλλιεργημένων ζυμών. Από το 1970 και μετά οι περισσότερες οινοποιήσεις πραγματοποιούνται με την χρήση τέτοιων ζυμών λόγω των πολλαπλών οφελών που προσφέρουν. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των παραπάνω μεθόδων θα αναλυθούν σε επόμενη παράγραφο.

1.1. Γλεύκος

Ως γλεύκος καλείται σύμφωνα και με την εθνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία το προϊόν που λαμβάνεται φυσικώς ή με φυσική επεξεργασία από νωπά σταφύλια. Πολλά συστατικά υπάρχουν και στο τελικό προϊόν (οίνο) είτε μεταβάλλονται σε άλλα είτε απομακρύνονται, για αυτό τον λόγο είναι πολύ σημαντική η κατανόηση της σύστασης του. Το γλεύκος έχει πυκνότητα συνήθως από 1,050 έως 1,130 και αποτελείται από 1) 75 έως 80 % νερό 2) 17 έως 25% ζυμώσιμα σάκχαρα 3) ανόργανα άλατα, αρωματικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις, οργανικές ενώσεις κ.α. Η περιεκτικότητα αυτών δεν είναι σταθερή και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες φυσικούς ή ανθρώπινους. Κάποιοι από τους σημαντικότερους θεωρούνται το κλίμα της περιοχής, οι καιρικές συνθήκες, το έδαφος, η παροχή νερού, η επιλογή της ποικιλίας και της χρονικής στιγμής του τρύγου και η υγεία των σταφυλιών και της αμπέλου (Τσακίρης, 2017) .

1.2. Οίνος

Ως οίνος ορίζεται ένα αλκοολούχο ποτό το οποίο έχει προέλθει από μερική ή ολική αλκοολική ζύμωση γλεύκους ή νωπών σταφυλιών (Νόμος 396/76 ΦΕΚ 198/Α/31-7-1976). Το κατώτερο όριο αλκοολικού βαθμού που μπορεί να έχει ένας οίνος είναι 8,5% vol.

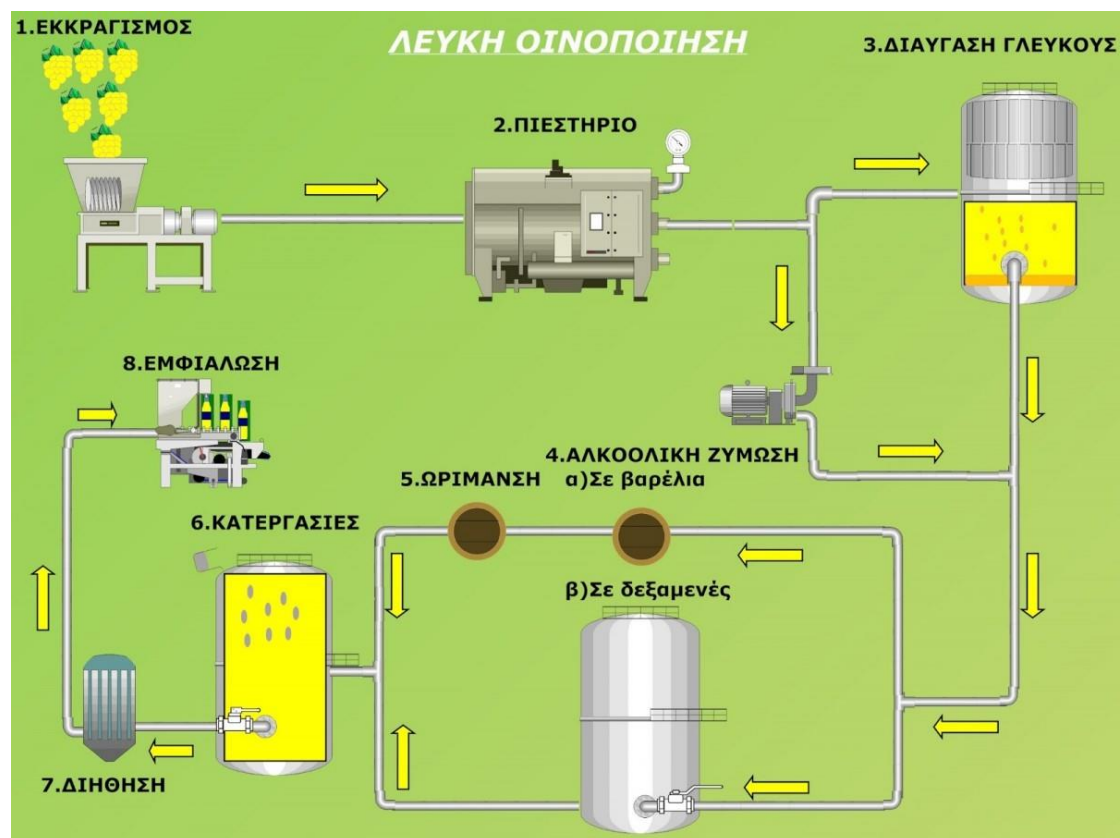
1.3. Βασικά στάδια οινοποίησης

Η οινοποίηση είναι μια διαδικασία όπου μπορεί να διαφέρει από οίνο σε οίνο και κατ' επέκταση από οινοποιείο σε οινοποιείο. Μπορούν να γίνουν διάφορες διαφοροποιήσεις σε πολλά στάδια με στόχο την επίτευξη διαφοροποίησης και πολυπλοκότητας του τελικού προϊόντος. Η λευκή οινοποίηση στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι λιγότερο σύνθετη σε σχέση με την ερυθρή οινοποίηση. Ο λόγος είναι ότι οι ερυθροί οίνοι χρειάζονται περισσότερα στάδια μέχρι την στιγμή της εμφιάλωσης καθώς εμπλέκονται παράγοντες όπως η εκχύλιση του χρώματος από τις φλούδες των σταφυλιών αλλά και η παλαίωση των οίνων προς επίτευξη ποιοτικότερου και πολυπλοκότερου προϊόντος. Όσον αφορά την λευκή οινοποίηση τα στάδια μέχρι την εμφιάλωση είναι συγκεκριμένα και είναι τα εξής:

Αρχικά, όταν το σταφύλι φτάσει στο οινοποιείο πρέπει να γίνει ο εκραγισμός του, δηλαδή η απομάκρυνση των κοτσανιών των σταφυλιών τα οποία αν παραμείνουν προσδίδουν στυφή και πικρή γεύση. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανήματος που ονομάζεται εκραγιστήριο. Προς επίτευξη καλύτερης ποιότητας, πριν από αυτό το στάδιο μπορεί να προηγηθεί και διαλογή των ραγών έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν άγουρες ή σάπιες ράγες οι οποίες μπορούν να βλάψουν το τελικό προϊόν. Μετά τον εκραγισμό ακολουθεί η σύνθλιψη των σταφυλιών, όπου σε αυτό το στάδιο απελευθερώνονται οι χυμοί του σταφυλιού και έρχονται σε επαφή με τις φλούδες. Έπειτα το γλεύκος οδηγείται στο πιεστήριο όπου πιέζεται με στόχο την παραλαβή του χυμού. Πολύ σημαντικός είναι ο τρόπος που θα πιεστεί το γλεύκος καθώς πρέπει να αποφευχθεί η εκτεταμένη πίεση, διότι υπάρχει κίνδυνος να περάσουν στο γλεύκος ανεπιθύμητες ουσίες από τα κουκούτσια και τις φλούδες. Αμέσως μετά την πίεση το γλεύκος οδηγείται κατά κανόνα σε ανοξείδωτες δεξαμενές όπου ψύχεται για μικρό χρονικό διάστημα (περίπου μια μέρα) έως ότου είναι έτοιμο για απολάσπωση. Η απολάσπωση είναι μια διαδικασία διαύγασης του γλεύκους όπου βασίζεται στην βαρύτητα. Τα μεγαλύτερα σωματίδια, τα οποία είναι και ανεπιθύμητα, καθιζάνουν λόγω βάρους στον πάτο της δεξαμενής οπότε μέσω αντλίας

αντλείται το πάνω μέρος του γλεύκους, που αποτελείται από χυμό αλλά και μικρότερα σωματίδια τα οποία όμως είναι επιθυμητά καθώς προσδίδουν πολυπλοκότητα και σώμα στο τελικό προϊόν. Η λευκή οινοποίηση συνεχίζεται με το σημαντικότερο κομμάτι της που είναι η αλκοολική ζύμωση, την μετατροπή δηλαδή των σακχάρων σε αλκοόλη. Το κομμάτι αυτό αναλύεται περαιτέρω σε επόμενη παράγραφο.

Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, ο οίνος πλέον μεταγίγεται στις δεξαμενές αποθήκευσης. Συνήθως είναι ανοξειδωτές δεξαμενές όπου ο οίνος αποθηκεύεται μέχρι την διήθηση είτε απευθείας την εμφιάλωση. Η αποθήκευση γίνεται και σε βαρέλια σε περίπτωση που ο οινοποιός θέλει να παλαιώσει τον λευκό οίνο του είτε θέλει να περάσει στο κρασί κάποια αρώματα που προέρχονται από το βαρέλι. Πολλές φορές μπορεί να επιλεχθεί ζύμωση και αποθήκευση σε βαρέλι για την επίτευξη πιο λιπαρής γεύσης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το επόμενο στάδιο είναι η διήθηση του οίνου. Το στάδιο αυτό μπορεί και να αποφευχθεί καθώς μέσω της διαδικασίας αυτής επιτυγχάνεται διαύγεια του οίνου αλλά χάνονται ορισμένα αρώματα του οίνου. Τέλος έχουμε την εμφιάλωση του οίνου όπου μέσω κάποιων μηχανημάτων που λέγονται εμφιαλωτήρια, ο οίνος καταλήγει στο μπουκάλι.



Εικόνα 1: Στάδια λευκής οινοποίησης.

1.4. Αλκοολική ζύμωση

Αλκοολική ζύμωση γενικότερα ως ζύμωση θεωρείται η διαδικασία παραγωγής ενέργειας μέσω της μετατροπής οργανικών ενώσεων όπως η αλκοόλη, ένα οξύ ή κάποια αλκοόλη. Όταν μιλάμε για αλκοολική ζύμωση εννοούμε την μετατροπή των σακχάρων ($C_6H_{12}O_6$) σε αιθυλική αλκοόλη μέσω της δράσης των ζυμών (Belitz H et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα ο ζυμομύκητας μέσω της γλυκολυτικής οδού μεταβολίζει την γλυκόζη και την φρουκτόζη σε πυροσταφυλικό οξύ. Το οποίο στην συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη, και στην συνέχεια η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε αιθανόλη (Ντουρτόγλου., 2018). Παράλληλα παράγονται και άλλες ουσίες όπως το διοξείδιο του άνθρακα, γλυκερόλη, οργανικά οξέα πτητικά και μη, ανώτερες αλκοόλες και πτητικοί εστέρες. Η παραγωγή των παραπάνω ουσιών εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης αλλά και τις συνθήκες ζύμωσης ενώ οι παραπάνω ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο στον οργανοληπτικά στο τελικό προϊόν, για παράδειγμα σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης έχουμε παραγωγή περισσότερων πτητικών εστέρων (Killian and Ough et al., 1979). Πολλές φορές παρατηρούμε χαμηλή κινητικότητα στην ζύμωση μέχρι και κολλημένες ζυμώσεις λόγω διάφορων παραγόντων και παράλληλα παραγωγή αρωματικών ουσιών που επιδρούν αρνητικά στο κρασί (off -flavors). Κάποιοι από αυτούς είναι η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, ένα κατάλληλα ανεπτυγμένο εμβόλιο, υψηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων αλκοόλης ή θειώδους από όση αντέχουν οι ζύμες αλλά και η θερμοκρασία ζύμωσης. Για τους παραπάνω λόγους είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη μας τις συνθήκες ζύμωσης πριν διαλέξουμε το στέλεχος της ζύμης.

Η αλκοολική ζύμωση μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω εμβολιασμού είτε αυθόρμητα. Ο εμβολιασμός επιτυγχάνεται μέσω χρήσης εμπορικών ζυμών και όπως έχει προαναφερθεί αποτελεί τον πιο δημοφιλή τρόπο ζύμωσης διότι είναι ασφαλής, έχει επαναληψιμότητα και μειωμένο κίνδυνο σφάλματος. Συνήθως οινοπαραγωγοί με μεγάλο όγκο κρασιών χρησιμοποιούν αυτήν την μέθοδο για να μειώσουν και το ρίσκο στο τελικό τους προϊόν. Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι παραγωγοί επιλέγουν ζυμώσεις με την χρήση αυτόχθονων ζυμών άρα αυθόρμητες αλκοολικές ζυμώσεις. Οι λόγοι που επιλέγουν αυτόν τον τρόπο εκκίνησης της ζύμωσης είναι επειδή πιστεύουν είτε ότι θα τους δώσει καλύτερο αποτέλεσμα είτε ότι θα εκφράσουν το *terroir* της περιοχής του σταφυλιού είτε επειδή θέλουν να έχουν ένα τελείως διαφορετικό αποτέλεσμα από τους υπόλοιπους (Tufariello et al., 2014). Οι

αυθόρμητες ζυμώσεις έχουν το αρνητικό της μη επαναληψιμότητας, διότι σε κάθε οινοποίηση είναι διαφορετικά τα στελέχη ζυμών στο περιβάλλον είτε αυτά που επικρατούν τελικώς στην ζύμωση. Ένας ενδιάμεσος τρόπος είναι η εκκίνηση της ζύμωσης με χρήση άγριων ζυμών, οι οποίες έχουν απομονωθεί εργαστηριακά και στην έχουν καλλιεργηθεί. Αυτή η διαδικασία δίνει την δυνατότητα στον οινοπαραγωγό να απομονώσει τις ζύμες από τον οίνο την χρονιά που πιστεύει ότι είχε το καλύτερο αποτέλεσμα και να έχει την δυνατότητα να τις χρησιμοποιεί κάθε χρόνο.

1.5. Βασικές οινολογικές αναλύσεις

1.5.1. Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι από τα σημαντικότερα συστατικά του γλεύκος διότι με την βοήθεια των ζυμών μετατρέπονται σε αιθυλική αλκοόλη και έτσι έχουμε το τελικό προϊόν που ονομάζεται οίνος. Εάν κάποια από αυτά δεν ζυμωθούν προσδίδουν στον οίνο γλυκιά γεύση και βοηθάνε στην συντήρηση του. Τα σάκχαρα τα οποία βρίσκονται στο γλεύκος προέρχονται από την σάρκα του σταφυλιού σε περιεκτικότητα 150 -300 g/l αναλόγως την ποικιλία, τον βαθμό ωρίμανσης και τον βαθμό πίεσης του σταφυλοπολλτού. Ο πρόρωγος περιέχει περισσότερα σάκχαρα και όσο πιέζουμε η περιεκτικότητα μειώνεται. Σε μεγαλύτερη αναλογία βρίσκονται τα ανάγοντα σάκχαρα γλυκόζη φρουκτόζη αλλά συναντάμε και αλλά σε μικρότερες ποσότητες όπως την γαλακτόζη μαννόζη (με έξι άτομα άνθρακα) αλλά και την αραβινόζη, ξυλόζη, πεντόζη (με πέντε άτομα άνθρακα) οι οποίες όμως δεν καταναλώνονται από τις ζύμες. Στο γλεύκος η σχέση γλυκόζη προς φρουκτόζη είναι περίπου 0,95 ενώ στο τέλος την ζύμωσης στα κρασιά με αρκετά υπολειπόμενα σάκχαρα είναι πολύ πιο κάτω. Αυτό συμβαίνει διότι η γλυκόζη είναι λιγότερο σταθερή από την φρουκτόζη και καταναλώνεται πιο άμεσα από τους σακχαρομύκητες, μια ακόμη διαφορά τους είναι ότι η γλυκόζη έχει γλυκαντική ικανότητα 0,73 ενώ η φρουκτόζη 1,73 (Τσακίρης, 2017).

1.5.2. Οργανικά οξέα στο κρασί

Τα οργανικά οξέα είναι από τα πιο σημαντικά συστατικά στον οίνο διότι συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του κρασιού και στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα τόσο κατά την διάρκεια της ζύμωσης όσο και κατά την ωρίμανση και παλαίωση. Επίσης προστατεύουν το κρασί από πιθανές χημικές ή μικροβιολογικές προσβολές. Τα κυριότερα οξέα του κρασιού τα οποία

προέρχονται από το σταφύλι είναι το τρυγικό ($C_4H_6O_6$), το μηλικό ($C_4H_6O_5$) και το κιτρικό ($C_6H_8O_7$) και από την ζύμωση το οξικό (CH_3COOH), το ηλεκτρικό ($C_4H_6O_4$) και μυρμηκικό (CH_2O_2) (Robles et al., 2019). Ένα ακόμη σημαντικό οξύ όπου συναντάται πολλές φορές στον οίνο είναι το γαλακτικό οξύ το οποίο προέρχεται από την μετατροπή του μηλικού σε γαλακτικού μέσω της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων.

Η ολική οξύτητα ή ογκομετρούμενη οξύτητα ορίζεται ένα μέτρο μέτρησης του συνόλου των ελεύθερων οργανικών οξέων ενός γλεύκους ή ενός οίνου και δεν είναι πάντα ανάλογη της αίσθηση του ξινού οργανοληπτικά (Chidi et al., 2018). Αντιθέτως, το pH (αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξυλίου) που ορίζεται το σύνολο των οξέων που βρίσκονται σε διάσταση, είναι ανάλογο της αίσθησης του ξινού (Στέλιος Λιοδάκης, 2012).



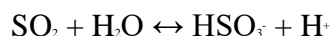
Εικόνα 2 : Πεχάμετρο. Εργαστηριακό όργανο που μετράει το pH.

Η υψηλή οξύτητα και το χαμηλό pH είναι κατασταλτικοί παράγοντες για την ανάπτυξη διαφόρων επιμολύνσεων στον οίνο. Οι συνηθισμένες τιμές ογκομετρούμενης οξύτητας είναι 5-8.5 (g/L) στους λευκούς οίνους και στους ροζέ, 6-8 (g/L) στους ερυθρούς και 5.5-8 (g/L) στους γλυκούς. Το pH κυμαίνεται από 3 έως 3.8 με μεγαλύτερες τιμές στα γλυκά και στα ερυθρά κρασιά.

1.5.3. Διοξείδιο του θείου (SO_2)

Το διοξείδιο του θείου, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες στην διαδικασία της οινοποίησης λόγω κάποιων ιδιοτήτων που διαθέτει αλλά και για την προσφορά του στην τελική διαμόρφωση του οργανοληπτικού χαρακτήρα του

οίνου. Αρχικά διακρίνουμε το θειώδες σε δύο μορφές: το ελεύθερο θειώδες και το δεσμευμένο. Σε pH λοιπόν 3,0-4,0 παρατηρείται η εξής γλυκόλυση:



Το ελεύθερο θειώδες λοιπόν παίρνει τις εξής μορφές: Το μοριακό SO_2 (η πιο δραστική μορφή) και η ιονισμένη μορφή HSO_3^- όπου είναι 10 φορές λιγότερο δραστική από την μοριακή. Όσο μεγαλύτερο είναι το pH τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του μοριακού θειώδους, ενώ όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται εξίσου και η συγκέντρωσή του. Η αναλογία μοριακού/ιονισμένου εξαρτάται και από την συγκέντρωση της αλκοόλης. Η αυξημένη συγκέντρωση μοριακού θειώδους επηρεάζει και τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου (ελαττωματική οσμή).

Το θειώδες έχει την ικανότητα να ενώνεται με καρβονύλια, αλδεΐδες, κετόνες προς σχηματισμό διάφορων ενώσεων είτε σταθερών είτε ασταθών. Σταθερές ενώσεις σχηματίζει με την γλυκόζη, όπου δημιουργούνται ενώσεις που λειτουργούν ως αποθήκη SO_2 αλλά και με την ακεταλδεΐδη, που σχηματίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δημιουργώντας ενώσεις με αρνητικές επιπτώσεις στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου. Λιγότερο σταθερές ενώσεις σχηματίζει με τα σάκχαρα, αλλά και με τις ανθοκυάνες παράλο που παρατηρείται αποχρωματισμός, με μείωση του SO_2 λόγω οξειδωσης επανέρχεται ξανά το χρώμα.

Το θειώδες έχει και ορισμένες ιδιότητες που το κάνουν σημαντικό. Αυτές είναι οι εξής:

- Αντιοξειδωτική δράση: Προστατεύει τα συστατικά που οξειδώνονται εύκολα καθώς οξειδώνεται το ίδιο ενώνεται δηλαδή με το οξυγόνο και σχηματίζει H_2SO_4 . Η πιο δραστική μορφή είναι τα ιόντα του, ενώ το δεσμευμένο SO_2 δεν έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Αντισηπτική δράση: Και πάλι το μοριακό θειώδες είναι περισσότερο υπεύθυνο για αυτήν την ιδιότητα. Έτσι το θειώδες προστατεύει από διάφορα βακτήρια τα οποία είναι βλαβερά στο γλεύκος, από άγριες ζύμες οι οποίες μπορεί να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές επιπτώσεις στο γλεύκος, ενώ μεγαλύτερη αντοχή στην δράση αυτή του θειώδους παρουσιάζουν οι ζύμες είδους *S. cerevisiae*.
- Δεσμευτική ικανότητα: Δεσμεύει την ακεταλδεΐδη και άλλες καρβονυλικές ενώσεις με αποτέλεσμα να προστατεύει τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου.

- Αντιοξειδωτική δράση: Παρεμποδίζεται η δράση οξειδωτικών ενζύμων που τυροσινάση, λακάση, οι οποίες είναι ενζυμικοί καταλύτες της οξείδωσης (Margalit.,1997).

Κάποια ακόμα θετικά στοιχεία είναι ότι βοηθάει στην εκχύλιση του χρώματος από τα στέμφυλα στον γλεύκος, επιβραδύνει την δράση των αυτόχθονων *non Saccharomyces* ζυμών το οποίο οδηγεί σε μια πιο ομαλή ζύμωση και δίνει στους λευκούς οίνους την δυνατότητα απολάσπωσης τις πρώτες ώρες. Το θειώδες όμως έχει και αρνητικές επιδράσεις όσον αφορά τις ζύμες. Αρχικά σε μεγάλες ποσότητες στο γλεύκος επιμηκύνει την φάση αναμονής των ζυμών, καθυστερώντας έτσι πολύ την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης ή με πιθανότητα να μην ξεκινήσει. Αυξάνει τον χρόνο ζύμωσης ενώ μπορεί να επιταχύνει το χρόνο θανάτωσής τους. Βέβαια το αν οι επιδράσεις αυτές είναι έντονες ή όχι εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το στέλεχος της ζύμης που χρησιμοποιείται/επικρατεί.

Το θειώδες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μορφές με την πιο συνήθης, το μεταδιθειώδες κάλιο $K_2S_2O_5$ (μεταμπισουλφίτ) λόγω της ευκολίας στην χρήση αλλά και της μικρότερης οσμής κατά την χρήση καθώς διαλύεται σε νερό πριν την χρήση και έχει 50% απόδοση σε SO_2 . Εκτός από την ποσότητα που προσθέτουμε, οι ζύμες παράγουν και εκείνες μια ποσότητα θειώδους, η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες ζύμωσης αλλά και από τα στελέχη. Τα μέγιστα όρια είναι 200 mg/L για τα λευκά και τα ροζέ και 150 mg/L για τα ερυθρά με αζύμωτα σάκχαρα λιγότερο από 5 g/L. Επίσης για τα κρασιά με τουλάχιστον 5g/L αζύμωτα, 250 mg/L για τα λευκά και τα ροζέ και 200 mg/L για τα ερυθρά(Σουφλερός., 2015).

1.5.4. Αιθυλική αλκοόλη

Η αιθυλική αλκοόλη ή αλλιώς αιθανόλη είναι μια πολύ σημαντική οργανική χημική ουσία λόγω των πολλών τρόπων χρήσεων της. Χρησιμοποιείται ευρέως για φαρμακευτικά σκευάσματα, καλλυντικά, ως καύσιμο, στην χημική βιομηχανία. Όσον αφορά τον οίνο παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων του κρασιού, στην αντοχή του οίνου σε βακτηριακές ασθένειες καθώς και την αντοχή στο χρόνο. Οργανοληπτικά δίνει δομή στο κρασί, προσφέρει μια αίσθηση γλυκάδας, μια πιθανή αίσθηση καψίματος στο στόμα και μειώνει την πτητικότητα των αρωματικών ενώσεων. Στο κρασί παράγεται μέσω της διαδικασίας της

αλκοολικής ζύμωσης και την συναντάται συνήθως σε ποσότητες 11-15% (v/v). Βάσει του ορισμού, αλκοολικός τίτλος είναι ο όγκος άνυδρης αιθυλικής αλκοόλης (1 ή mL) σε 100 όγκους οίνου (L ή mL) στους 20° C .

1.5.5. Αφομοιώσιμο άζωτο

Το άζωτο είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία που πρέπει να εξετάζονται σε έναν μούστο, καθώς αποτελεί τροφή για τους ζυμομύκητες, διευκολύνοντας έτσι την κινητική της ζύμωσης και βοηθάει στην αποφυγή δυσάρεστων αναγωγικών οσμών. Στην αρχή της ζύμωσης οι ζύμες καταναλώνουν άμεσα μεγάλη ποσότητα αζώτου ώστε μέσω τον αμινοξέων ή του αμμωνιακού αζώτου να συνθέσουν πρωτεΐνες και να αναπτυχθούν. Γλεύκη που δεν περιέχουν αρκετό άζωτο μειώνουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων που έχει ως αποτέλεσμα αργή ή μη ολοκληρωμένη ζύμωση. Επιπρόσθετα οι ζύμες σε αυτήν την περίπτωση έχουν αυξανόμενο μεταβολικό στρες και παράγουν ανεπιθύμητες οσμές όπως τα δισουλφίδια. Το άζωτο στο γλεύκος υπάρχει σε δύο μορφές: στην ανόργανη και την οργανική. Στην ανόργανη μορφή ανήκουν τα ιόντα αμμωνίου NH_4^+ το οποίο προέρχεται από άλατα οργανικών οξέων που είναι αφομοιώσιμα. Αυτό συμβαίνει διότι το ανιόν που παραμένει στο διάλυμα δεν μειώνει το pH. Η οργανική μορφή αποτελείται από τα α-αμινοξέα και τα ολιγοπεπτίδια των πρωτεϊνών τα οποία είναι αφομοιώσιμα από κάποια στελέχη ζυμών. Το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) περιλαμβάνει το αμμωνιακό άζωτο (NH_4^+) και το οργανικό άζωτο εξαιρουμένης της προλίνης (αμινοξύ). Η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών γίνεται στο εσωτερικό της ζύμης διότι εκεί βρίσκονται τα σημεία δράσεις των ενζύμων. Οι θρεπτικές ενώσεις μπορούν και εισχωρούν παθητικά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης είτε μέσω επιλεκτικών υποδοχέων. Οι ζύμες είναι ικανές να καταναλώσουν έως και 400 mg/L άζωτο ενώ κάτω από 140 mg/L υπάρχει κίνδυνος για ανεπιθύμητες ουσίες στον τελικό οίνο. Συνήθως στα λευκά κρασιά παρατηρούμε μια ποσότητα αζώτου 70-200 mg/L ενώ στα ερυθρά αυτή η ποσότητα είναι αυξημένη λόγω της μακράς εκχύλισης των στερεών συστατικών.

1.5.6. Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ (CH_3COOH) είναι το πιο σημαντικό πτητικό οξύ που συναντάμε στους οίνους. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει οσμή ξυδιού και συνήθως υποδηλώνει ότι ο οίνος έχει προσβληθεί από οξικά ή γαλακτικά βακτήρια. Όμως είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό οξικών εστέρων οι οποίοι συμβάλλουν στον φρουτώδη χαρακτήρα του οίνου και συνεισφέρει στη πολυπλοκότητα του οίνου. Οι ζύμες παράγουν

περίπου 200 με 500 mg/L οξικό οξύ μέχρι την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, η ακριβής ποσότητα εξαρτάται από το στέλεχος και τις συνθήκες ζύμωσης. Οξικό οξύ παράγεται μέσω της ζύμωσης από την εκάστοτε ζύμη που χρησιμοποιείται. Κάθε ζύμη παράγει διαφορετικές τιμές ενώ υπάρχουν και συγκεκριμένα γένη/είδη ζυμών οι οποίες ευνοούν την παραγωγή του (Goold et al., 2017). Οι συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή του είναι: το pH χαμηλότερο από 3 ή μεγαλύτερο από 5, η θερμοκρασία ζύμωσης 20-30°C, η αναεροβίωση, και η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, το οποίο οφείλεται στην προσπάθεια της ζύμης να προσαρμοστεί σε περιβάλλον υψηλών σακχάρων λόγω ωσμωτικής πίεσης, αλλά και η χαμηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα. Το οξικό οξύ μπορεί να παραχθεί και από οξικά βακτήρια, ορισμένα στελέχη ζυμών ευνοούν την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων. Κατά την επιλογή των στελεχών θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα οξικού που παράγει η ζύμη αλλά και πόσο ευνοεί την παραγωγή του. Ακόμα μια σημαντική ποσότητα (200-400 mg/L) παράγεται κατά την μηλογαλακτική μετατροπή και από την επίδραση του *Botrytis cinerea* και άλλων ασθενειών στο σταφύλι. Τέλος παράγεται από την χημική οξείδωση της αιθανόλης με την παρουσία οξυγόνου που έρχεται σε επαφή από την συγκομιδή μέχρι και την φιάλη (Delfini et al., 2001).

1.6. Ασύρτικο

Μια σπάνια ελληνική λευκή ποικιλία με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά η οποία παράγει κρασιά παγκόσμιας φήμης. Είναι γηγενής ποικιλία της Σαντορίνης αλλά έχει εξαπλωθεί και σε άλλα μέρη της Ελλάδας όπως στην Μακεδονία, την Θράκη, την Πελοπόννησο αλλά και σε άλλα μέρη παγκοσμίως όπως την Αυστραλία. Συμμετέχει σε 5 οίνους ΠΟΠ (προστατευόμενης ονομασία προέλευσης) οίνους στην Ελλάδα με πιο γνωστή την ΠΟΠ Σαντορίνη με ξηρούς και γλυκούς οίνους (vinsanto). Ακόμα συμμετέχει στην ΠΟΠ πλαγιές Μελίτωνα στην περιφερειακή ενότητα Χαλκιδικής, στην ΠΟΠ Μονεμβασιά - Malvazia ως γλυκός οίνος στον νοτιοανατολικού άκρου της περιφερειακής ενότητας Λακωνίας, στην ΠΟΠ Ρόδου στην Ρόδο αλλά και στην ΠΟΠ Πάρου ως γλυκός οίνος (N.A Νικολάου, 2012). Είναι μια ποικιλία με μεγάλη προσαρμοστικότητα η οποία φαίνεται από τις διαφορετικές περιοχές στις οποίες παράγει οίνους ποιότητας, με μεγάλη αντοχή στον περονόσπορο, ωίδιο, βοτρυτή αλλά και στην ξηρασία κρατώντας την υψηλή του οξύτητα. Το γλεύκος από την ποικιλία Ασύρτικο περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων 250-260 g/L, υψηλή οξύτητα με ολική οξύτητα 7-9,5 g/L εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ, μέσο pH 3,10-3,30 αρκετές τανίνες

για λευκή ποικιλία αλλά και ευοξειδωτες ουσίες. Παράγει οίνους με υψηλή οξύτητα και αλκοόλ και συμπυκνωμένες γεύσεις, μέτριο έως γεμάτο σώμα και λεμονο-πράσινο χρώμα και αναλόγως με τρόπο παραγωγής αλλά και την τοποθεσία δίνει αρώματα από εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα, τροπικά φρούτα, άνθη αλλά και ορυκτότητας στην ξηρή του μορφή. Ενώ στην γλυκιά του μορφή δίνει οίνους με χρυσαφένιο έως κεχριμπαρένιο χρώμα (ανάλογα με την παλαίωση), γεμάτο σώμα υψηλή οξύτητα και αρώματα από γλυκά μπαχαρικά όπως κανέλα και γαρίφαλα μέχρι αποξηραμένα φρούτα, όπως βερίκοκα και σταφίδες. Η υψηλή του οξύτητα το μέτριο προς γεμάτο σώμα το υψηλό αλκοόλ αλλά και οι τανίνες του δίνουν μεγάλη δυνατότητα παλαίωσης η οποία προσδίδει πολύπλοκα αρώματα ώριμων φρούτων μελιού κηρήθρας και μαρμελάδας.

2. Ζύμες

Ζυμομύκητες ή ζύμες είναι ευκαριωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι εντάσσονται στο βασίλειο των μυκήτων. Συμμετέχουν καθοριστικά στην αλκοολική ζύμωση καθώς απελευθερώνουν χρήσιμα συστατικά τα οποία προσδίδουν πολυπλοκότητα στον οίνο. Ακόμη από όσο γνωρίζουμε κάθε στέλεχος ζυμών μπορεί να παράγει και οίνους με διαφορετικά αρώματα (Τσακίρης, 2017). Στην βιομηχανία των ποτών και πιο συγκεκριμένα του οίνου αρκετά είδη ζυμών έχουν μεγάλη οικονομική και λειτουργική σημασία διότι προσδίδουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν (Comitini et al., 2011). Πρωταγωνιστής στην κατηγορία αυτή είναι ο ζυμομύκτης *Saccharomyces cerevisiae*. Οι ζύμες μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις εμπορικές και τις γηγενείς ή αυτόχθονες ζύμες.

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Ο ζυμομύκτης *Saccharomyces cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών και τροφίμων για χιλιάδες (Sylvie Dequin et al., 2011) και είναι ο πιο συνηθισμένος σε χρήση όσον αφορά ζύμωση γλεύκους. Είναι μονοκύτταρος μικροοργανισμός με σφαιρικό-ελλειψοειδές σχήμα. Ο κύριος λόγος κυριαρχίας του στην βιομηχανία των ζυμών είναι η υψηλή αντοχή που έχει σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης καιθειώδους (García-Ríos et al., 2019), η οποία είναι τοξική σε άλλους μικροοργανισμούς non-*Saccharomyces*. Έχει υψηλή ζυμωτική

ικανότητα και συνεισφέρει στην βελτίωση των θετικών και ελκυστικών αρωμάτων του κρασιού. Η χρήση επιλεγμένων στελεχών *S.cerevisiae* στην αλκοολική ζύμωση είναι συνηθισμένη τεχνική και χρησιμοποιείται για χρόνια για να διασφαλιστεί η ομαλή ολοκλήρωση και πλήρης κατανάλωση των σακχάρων της ζύμωσης. Όμως ένα πρόβλημα που έχει παρατηρηθεί είναι ότι λόγω της κλιματικής αλλαγής τα αμπέλια ωριμάζουν περισσότερο και αναπτύσσουν υψηλότερο ποσοστό σακχάρων με αποτέλεσμα πολλές φορές οι ζύμες να μην προσαρμόζονται στην αλλαγή αυτή και να παρατηρούνται προβλήματα στην ζύμωση όπως καθυστέρηση την λήξης της είτε διακοπή της στο ενδιάμεσο.

Ο *S. cerevisiae*, έχει βέλτιστη ζυμωτική ικανότητα στην θερμοκρασία 25-30°C όμως σε αυτήν την θερμοκρασία δεν παράγονται οι καλύτερης ποιότητας οίνοι. Αντίθετα σε θερμοκρασία 15°C, η οποία είναι η ελάχιστη για την ανάπτυξη του παράγονται εξαιρετικής ποιότητας οίνοι. Επειδή όμως σε χαμηλές θερμοκρασίες η ζύμωση προχωρά με αργούς ρυθμούς, η βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης για την ζύμη αυτή κυμαίνεται από 18-20°C. Για να αναπτυχθεί, χρειάζεται ορισμένα θρεπτικά συστατικά όπως άνθρακα, άζωτο, βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία τα οποία μπορούν να βρεθούν είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα (Andorra et al., 2010).

2.2. Εμπορικές και γηγενείς ζύμες.

Με στόχο την επίτευξη επιτυχημένων ζυμώσεων, διάφορες εταιρίες δημιούργησαν αφυδατωμένα κύτταρα ζυμομυκήτων, τα οποία ονομάζονται εμπορικά στελέχη ζυμών ή απλούστερα εμπορικές ζύμες. Πολύ σημαντικό ρόλο στην αυξανόμενη χρήση επιλεγμένων ζυμών έπαιξε η επαναληψιμότητα του τελικού αποτελέσματος. Ο οινοπαραγωγός επιλέγει κάποιο στέλεχος ζύμης το οποίο ταιριάζει στην ποικιλία του σταφυλιού αλλά και στον οίνο που θέλει να παράγει και έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιεί κάθε χρόνο τον ίδιο. Κάποια ακόμα θετικά είναι ότι οι ερευνητές έχουν απομονώσει στελέχη ζυμών που είναι πιο ανθεκτικά σε συγκεκριμένες συνθήκες όπως η ποσότητα σακχάρων, θειώδους αλλά και στην θερμοκρασία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τις μη προβληματικές ζυμώσεις και επίσης στην κατανάλωση όλης της ποσότητας των σακχάρων ακόμα και σε δύσκολες συνθήκες αλλά και την αποφυγή δυσάρεστων οσμών και γεύσεων στο τελικό προϊόν (Howell et al., 2006). Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα να κυκλοφορούν στο εμπόριο συγκεκριμένα στελέχη ζυμών με το καθένα να έχει διαφορετική ανθεκτικότητα σε κάθε συνθήκη ζύμωσής και να παράγει διαφορετικό οργανοληπτικά στον οίνο (Ronald et al, 2014).

Εξαιτίας της συνεχούς χρήσης επιλεγμένων εμπορικών ζυμών όλο και περισσότεροι παραγωγοί επιλέγουν ζυμώσεις με την χρήση γηγενών ζυμών ή αυτόχθονων ή απλούστερα ‘άγριων’ ζυμών. Γηγενείς ζύμες είναι εκείνες που συναντάμε πάνω στο σταφύλι και μεταφέρονται στην δεξαμενή ζύμωσης μέσω της έκθλιψης των σταφυλιών (Barata et al., 2012). Οι οίνοι που παράγονται μέσω χρήσης αυτών των ζυμών διαφέρουν από τους οίνους που παράχθηκαν με εμπορικές ζύμες ως προς την πολυπλοκότητα, τον ιδιαίτερο χαρακτήρα που διαθέτουν και παραμένουν ανέπαφα τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε ποικιλίας (Kai Chen et al., 2021). Όμως εγκυμονούν και ορισμένοι κίνδυνοι κατά την διάρκεια της χρήσης τους. Αρχικά έχουμε έλλειψη τυπικότητας και επαναληψιμότητας διότι σε κάθε χρονιά παρατηρείτε διαφορετικός αριθμός και διαφορετικά είδη γηγενών ζυμών στο σταφύλι. Παρατηρείται επίσης αργή εκκίνηση της ζύμωσης καθώς οι άγριες ζύμες έχουν μικρότερη συγκέντρωση κυττάρων συγκριτικά με τις εμπορικές ζύμες με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η έναρξη της ζύμωσης. Στην κινητική των ζυμώσεων παρατηρούνται επίσης αργές χρονικά ζυμώσεις διότι συνήθως οι γηγενείς ζύμες έχουν μεγαλύτερη αντίσταση στο αλκοόλ συγκριτικά για παράδειγμα με εμπορικές ζύμες *S. cerevisiae* με αποτέλεσμα πολλές φορές υψηλές τιμές υπολειμματικών σακχάρων που δεν ζυμώθηκαν (Zott et al., 2008). Τέλος μπορεί να δημιουργηθούν ανεπιθύμητα υποπροϊόντα λόγω ύπαρξης ζυμών που δεν ευνοούν αλκοολική ζύμωση με αποτέλεσμα ο οίνος να αποκτά δυσάρεστες οσμές.

2.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται εκτός από τα βασικά προϊόντα (το διοξείδιο του άνθρακα και η αιθυλική αλκοόλη) και άλλα προϊόντα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τελικού οίνου. Ένα από αυτά είναι γλυκερόλη η οποία προέρχεται από τα σάκχαρα και παράγεται από τη φωσφορική διυδροξυακετόνη μέσω δύο ενζυματικών αντιδράσεων . Μια αυξημένη συγκέντρωση γλυκερόλης στον οίνο προσδίδει μια γλυκιά γεύση και αυξάνει το ιξώδες του οίνου άρα και το σώμα του. Μια άλλη σημαντική παράμετρος για τον οίνο ,είναι η πτητική οξύτητα (συνήθως είναι μεταξύ 0,3– 0,6 g/L) (E. Mataix et al., 1999) και το 90% περίπου όλης της πτητικής οξύτητας αποτελείται από οξικό οξύ. Συγκεντρώσεις πάνω από 0,8 g/L μπορεί να αποφέρουν καταστρεπτικές συνέπειες για το άρωμα του κρασιού, που συνήθως μεταφράζεται ως πολύ όξινη γεύση και άρωμα ξυδιού . Τα στελέχη *S.cerevisiae* παράγουν 100 – 200 mg/L όπου επηρεάζεται από το

στέλεχος της ζύμης (Shimazu and Watanabe 1981), το pH, τα σάκχαρα και την συγκέντρωση αζώτου και άλλων θρεπτικών ουσιών. Οι ανώτερες αλκοόλες επιδρούν θετικά στο άρωμα του οίνου, αλλά αν η συγκέντρωσή τους είναι υψηλότερη από 400mg/L, μπορεί να έχουν και αρνητικές επιδράσεις στην ποιότητα του οίνου. Ανάμεσα στις ανώτερες αλκοόλες, η ισοαμυλική αλκοόλη είναι αυτή που συναντάμε περισσότερο στο κρασί, αφού αντιπροσωπεύει πάνω από 50% των συνολικών ανώτερων αλκοολών. Τα στελέχη *S.cerevisiae*, είναι ικανά να παράγουν υψηλά ποσά ισοαμυλικής αλκοόλης συγκριτικά με καλλιέργειες non- *Saccharomyces* ζυμών. Βέβαια αυτή η διαφορά δεν γίνεται αντιληπτή όταν έχουν συν καλλιέργεια *Saccharomyces* με non- *Saccharomyces* ζυμών. Οι **εστέρες** είναι μια ομάδα πτητικών ενώσεων, που προέρχονται από την μεταβολική δραστηριότητα των ζυμών, που επηρεάζουν επί το πλείστον το αρωματικό προφίλ του οίνου. Τα φρουτώδη αρώματα των νέων οίνων καθορίζονται κυρίως από την ποιότητα και την ποσότητα των παραγόμενων εστέρων μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Οι σημαντικότεροι εστέρες οι οποίοι δίνουν στον οίνο ένα φρουτώδες άρωμα θεωρούνται οξικός εξυλεστέρας, ο καπροϊκός αιθυλεστέρας και ο οξικός ισοαμυλεστέρας (Fisher, 1973 σελ. 210). Οι ζύμες *S. cerevisiae*, παράγουν υψηλές ποσότητες εστέρων. Τα στελέχη *S. cerevisiae* παράγουν επίσης υψηλές ποσότητες ακεταλδεϋδης, από 50-120 mg/L. Οι θειούχες ενώσεις έχουν διαφορετικές επιδράσεις στον οίνο αν και οι περισσότερες από αυτές δρουν αρνητικά στο κρασί και στα αρώματα του. Η παραγωγή υδρόθειου είναι υπεύθυνη για τις δυσάρεστες οσμές στους οίνους χαρακτηριστικό άρωμα χαλασμένου αυγού και ειδικά όταν βρίσκεται σε συγκέντρωση υψηλότερη από 1 mg/L. Η ποσότητα υδρόθειου που θα παραχθεί φαίνεται να εξαρτιέται από πολλούς παράγοντες όπως από την παρουσία στοιχειακού θείου, την απουσία της κατάλληλης ποσότητας α-αμινο αζώτου και παντοθενικού οξέος αλλά και το στέλεχος της ζύμης. Ακόμη έχει αποδειχθεί ότι κάποια στελέχη ζυμών δεν είναι ικανά να παράγουν υδρόθειο (Eschenbruch et al.,1978). Τέλος ένας ακόμα δευτερογενής μεταβολίτης είναι η μανοπρωτεΐνη η οποία είναι ένα είδος γλυκοπρωτεΐνης, που παράγεται από τους ζυμομύκητες κατά την διαδικασία της ζύμωσης. Αποτελείται από έναν πυρήνα πρωτεΐνης που συνδέεται με ένα μόριο υδατάνθρακα, την μαννόζη. Η μανοπρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα προσδίδοντας ισορροπία και σώμα στον τελικό οίνο αλλά και στην πορεία της ζύμωσης. Ο οινολόγος έχει την δυνατότητα να ελέγξει την ποσότητα της είτε μέσω της επαφής με τις οινολάσπες, είτε

με την απευθείας προσθήκη αυτής, είτε μέσω της επιλογής στελέχους ζύμης που παράγει μεγαλύτερη ποσότητα αυτής.

2.4. Άρωμα οίνου

Το άρωμα του οίνου οφείλεται στις πτητικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτόν. Χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, τα πρωτογενή, τα δευτερογενή και τα τριτογενή αρώματα. Στα πρωτογενή ανήκουν αρωματικές ουσίες που περιέχονται στο σταφύλι. Αποτελούνται κυρίως από τις εξής χημικές ενώσεις: Τερπένια, τερπενόλες, πυραζίνες, εστέρες και αλκοόλες όπως η μεθανόλη και η εξανόλη. Ως δευτερογενή ορίζονται τα αρώματα ζύμωσης, δηλαδή τα αρώματα που προκύπτουν κατά την αλκοολική ζύμωση, με την δράση των ζυμών και τις συνθήκες που επικρατούν. Οι κυριότερες χημικές ενώσεις που επικρατούν είναι οι ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, πτητικά λιπαρά οξέα, αλδεΐδες και θειούχες ενώσεις. Τα τριτογενή αρώματα ή αλλιώς το μπουκέτο του οίνου, αποτελούν τα αρώματα ωρίμανσης και παλαίωσης και οι βασικότερες χημικές ενώσεις που συναντάμε είναι οι εστέρες οι λακτόνες και οι αλδεΐδες (Englezos et al., 2018).

Όσον αφορά τα τερπένια εντοπίστηκαν αρχικά σε μοσχάτες ποικιλίες μέσω της της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και αργότερα όταν αναπτύχθηκαν περισσότερο οι μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας, βρέθηκαν πάνω από 70 ενώσεις και σε άλλες ποικιλίες σταφυλιού. Τις περισσότερες φορές τις συναντάμε στις φλούδες των σταφυλιών αλλά πολλές φορές και στην σάρκα (Wendler et al., 2015). Έχουν ευχάριστο άρωμα λουλουδιών και αυξάνονται κατά την ωρίμανση αλλά μειώνονται κατά την φάση της υπερωρίμανσης. Λόγω ότι τα τερπένια κατατάσσονται στα πρωτογενή αρώματα που υπάρχουν στο σταφύλι και δεν δημιουργούνται κατά την ζύμωση, η διαφοροποίηση των ποικιλιών μπορεί να γίνει και μέσω της ανάλυσης αυτών των ουσιών (Lukic et al., 2015).

Οι πυραζίνες προσδιορίστηκαν το 1975 με την πιο σημαντική την 2-μέθοξυ-3-ισοβούτυλο πυραζίνη η οποία έχει το χαρακτηριστικό άρωμα του πράσινου πιπεριού. Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται και σημαντικές ποσότητες από ανώτερες αλκοόλες οι οποίες συμμετέχουν σημαντικά στο αρωματικό προφίλ του παραγόμενου οίνου. Σχηματίζονται από τα σάκχαρα με σύνθεση από των αντίστοιχων α-κετονοξέων, έπειτα γίνεται αποκαρβοξυλίωση και αναγωγή προς αλκοόλες. Ακόμη μπορούν να σχηματιστούν από αμινοξέα μέσω της απαμίνωσης και της αποκαρβοξυλίωση. Κάποιες από τις πιο σημαντικές είναι η προπανόλη-1 και την βουτανόλη 1 οι οποίες έχουν οσμή

παρόμοια με την αιθανόλη. Επίσης τις αμυλικές αλκοόλες, την 2-μέθυλο-1-βουτανόλη και 3-μέθυλο-1-βουτανόλη με χαρακτηριστική δριμεία οσμή. Την φαίνυλο-2-αιθανόλη με το γνωστό άρωμα τριαντάφυλλου και την τυροσόλη με άρωμα μελιού (Helwi et al., 2015).

Επιπρόσθετα κατά την ζύμωση παράγονται και κάποια πτητικά οξέα τα οποία είναι κορεσμένα μονοκαρβονικά οξέα. Κάποια παραδείγματα είναι το βουτυρικό και ισοβαλεριανικό με άρωμα που θυμίζει τυρί, και την εξανόλη και εξανάλη με φυτικές οσμές που συναντάμε σε άγουρα σταφύλια. Είτε κατά την αλκοολική ζύμωση με την διαδικασία της ενζυμικής εστεροποίησης είτε κατά την παλαίωση μέσω της χημικής εστεροποίησης παράγονται εστέρες. Κάποιοι από αυτοί δίνουν στο κρασί ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα με εξαίρεση τον αιθυλικό αιθυλεστέρα ο οποίος σε μεγάλες συγκεντρώσεις και έχει δυσάρεστη οσμή.

Μια άλλη κατηγορία είναι οι εστέρες των λιπαρών οξέων με αιθανόλη όπως ο εξανικός αιθυλεστέρας προσδίδουν φρουτώδες άρωμα και οι εστέρες των ανώτερων αλκοολών με οξικό οξύ πχ ο οξικός ισοαμυλεστέρας με άρωμα μπανάνας (Carpene et al., 2021). Κατά την οينوποίηση παράγονται και δύο πτητικές φαινόλες η 4-βίνυλο-φαινόλη και 4-βίνυλο-γυναικόλη με άρωμα γαρύφαλλου. Τέλος κατά την ωρίμανση και την παλαίωση σχηματίζονται αργά εστέρες μέσω της χημικής εστεροποίησης της αιθανόλης με τα οξέα και δίνουν χαρακτηριστικά αρώματα που συναντάμε σε παλαιωμένους οίνους.

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι η αξιολόγηση γηγενών στελεχών *S. cerevisiae*, τα οποία απομονώθηκαν από Ελληνικούς οίνους ως προς το οινολογικό τους δυναμικό. Πιο συγκεκριμένα θα μελετηθεί η κινητική της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της ικανότητας μεταβολισμού ξεχωριστά της γλυκόζης και της φρουκτόζης και πληθώρα οινολογικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων οίνων. Ο τελικός στόχος είναι η επιλογή στελεχών ζυμομυκήτων με τα πλέον βέλτιστα τεχνολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για την μετέπειτα χρήση τους ως εναρκτήριες καλλιέργειες.

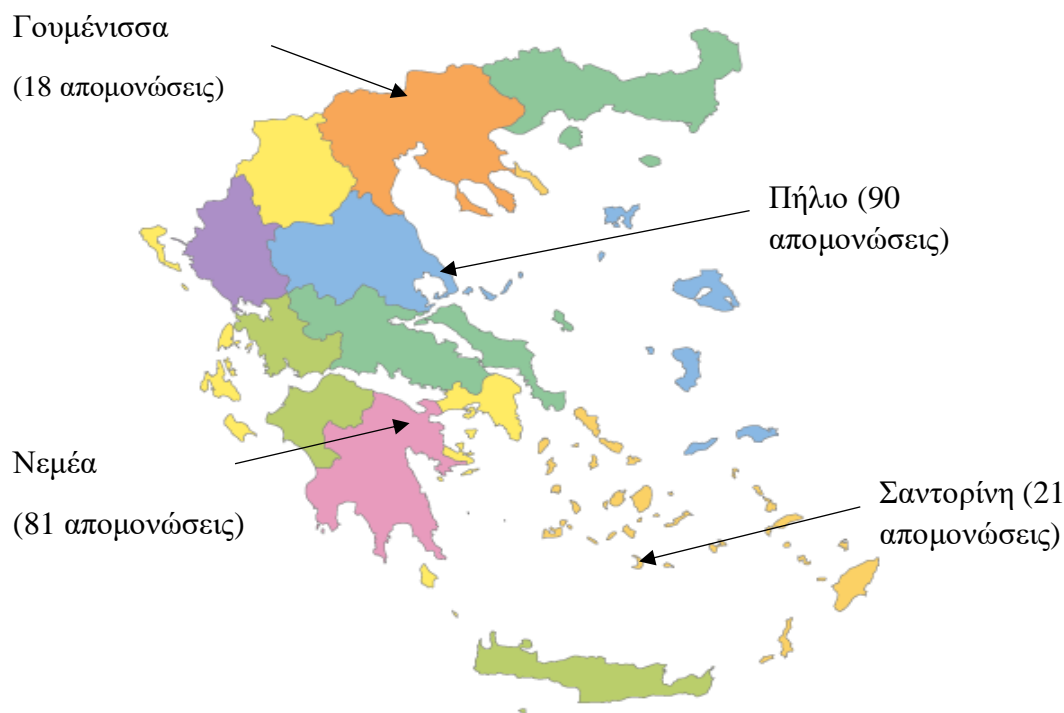
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Προέλευση στελεχών *S. cerevisiae*

Για την επίτευξη της παρούσας πτυχιακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ζυμομύκητες από την βιβλιοθήκη του εργαστηρίου μικροβιολογίας οίνου. Οι συγκεκριμένες ζύμες έχουν απομονωθεί από αυτόχθονες ζυμώσεις μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης από 14 οινικά δείγματα διαφόρων ποικιλιών (πίνακας 1) από τέσσερις διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (εικόνα 1). Τα 190 στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν σε ποσοστό 83,5% ως *Saccharomyces cerevisiae* ενώ η μοριακή ανάλυση σε επίπεδο στελέχους φανέρωσε την ύπαρξη 20 διαφορετικών στελεχών εντός του είδους.

Πίνακας 1: Στελέχη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν ανά περιοχή και ποικιλία.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ		Είδος	Περιοχή	Ποικιλία
A6	Y1	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y3	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y5	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y6	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y10	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y11	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y14	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
A24	Y2	<i>S.cerevisiae</i>	Πήλιο	Ξινόμαυρο
A26	Y5	<i>S.cerevisiae</i>	Πήλιο	Ασύρτικο
	Y11	<i>S.cerevisiae</i>	Πήλιο	Ασύρτικο
	Y22	<i>S.cerevisiae</i>	Πήλιο	Ασύρτικο
	Y23	<i>S.cerevisiae</i>	Πήλιο	Ασύρτικο
K30	Y15	<i>S.cerevisiae</i>	Νεμέα	Ασύρτικο
	Y18	<i>S.cerevisiae</i>	Νεμέα	Ασύρτικο
K32	Y9	<i>S.cerevisiae</i>	Νεμέα	Αγιωργίτικο
K33	Y4	<i>S.cerevisiae</i>	Νεμέα	Αγιωργίτικο
	Y11	<i>S.cerevisiae</i>	Νεμέα	Αγιωργίτικο
	Y14	<i>S.cerevisiae</i>	Νεμέα	Αγιωργίτικο
GB	Y2	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο
	Y5	<i>S.cerevisiae</i>	Σαντορίνη	Ασύρτικο



Εικόνα 3: Περιοχές και απομονώσεις ζυμών που πραγματοποιήθηκαν.

4.2. Μικρό-οινοποιήσεις πολύ μικρού όγκου (50 mL)

Για την αξιολόγηση της ζυμωτικής ικανότητας των 20 διαφορετικών στελεχών, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις των 50 mL όπου καθημερινά πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κατανάλωσης των σακχάρων (γλυκόζη- φρουκτόζη). Το αρχικό γλεύκος Ασύρτικου, θειώθηκε ελάχιστα (50 mg/L) και παστεριώθηκε (72° C, 10 min) ώστε να μην έχουμε αλληλεπίδραση με τις γηγενείς ζύμες και να παρατηρηθεί η ζυμωτική ικανότητα μόνο των μικροοργανισμών που εμβολιάσαμε.

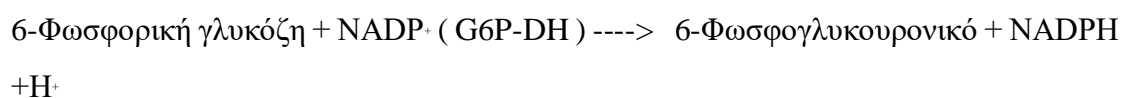
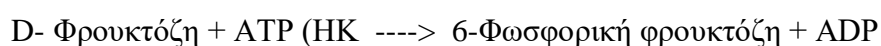
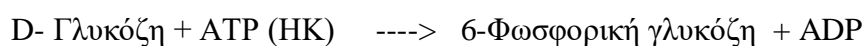
Το εμβόλιο προήλθε από το διαδοχικό και εις διπλούν εμπλουτισμό του υγρού θρεπτικού υποστρώματος YPD (10% yeast extract, 20% w/v peptone , 20% w/v dextrose) 28° C για 24 ώρες. Οι καλλιέργειες φωτομετρήθηκαν στα 600nm και η ποσότητα εμβολίου προσαρμόστηκε βάση της οπτικής πυκνότητας ώστε όλες οι εναρκτήριοι να έχουν αρχικό πληθυσμό 10^6 κύτταρα. Συνεπώς πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα 20 διαφορετικές ζυμώσεις των 50 mL με τα 20 διαφορετικά στελέχη *S.*

cerevisiae ως εναρκτήριες καλλιέργειες. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20° C και παρακολούθηθηκε η πορεία ζύμωσης του καθενός δείγματος ξεχωριστά με μέτρηση της κατανάλωσης σακχάρων (γλυκόζης/φρουκτόζης) ανά τακτά χρονικά διαστήματα (στην αρχή της ζύμωσης κάθε 6-12 ώρες και προς το τέλος της ζύμωσης κάθε 24 ώρες) . Τέλος επαναλήφθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία για την επίτευξη βιολογικής επανάληψης.

4.2.1. Μέτρηση κατανάλωσης σακχάρων (γλυκόζη-φρουκτόζη)

Η μέτρηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε μέσω του kit: Enzytec liquid D-Glucose / D-Fructose της εταιρίας r-biopharm και η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης και της φρουκτόζης γίνεται με μέθοδο που βασίζεται σε τέσσερις ενζυμικές αντιδράσεις που συμμετέχουν στην διαδικασία της γλυκόλυσης.



Πειραματική πορεία

α) Τυφλό

- Προσθέτουμε 200 μL από το αντιδραστήριο No1
- Προσθέτουμε 10 μL απεσταγμένο νερό
Αναδεύουμε και μετά 3 min μετράμε την απορρόφηση στα 340 nm (A_{340})
- Προσθέτουμε 50 μL από το αντιδραστήριο No2
Αναδεύουμε και μετά 15 min μετράμε την απορρόφηση στα 340 nm (A_{340})
- Προσθέτουμε 50 μL από το αντιδραστήριο No3
Αναδεύουμε και μετά 15 min μετράμε την απορρόφηση στα 340 nm (A_{340})

B) Δείγμα

- Προσθέτουμε 200 μL από το αντιδραστήριο No1
- Προσθέτουμε 10 μL δείγματος
Αναδεύουμε και μετά 3 min μετράμε την απορρόφηση στα 340 nm (A_1)
- Προσθέτουμε 50 μL από το αντιδραστήριο No2
Αναδεύουμε και μετά 15 min μετράμε την απορρόφηση στα 340 nm (A_2)
- Προσθέτουμε 50 μL από το αντιδραστήριο No3
Αναδεύουμε και μετά 15 min μετρούσε την απορρόφηση στα 340 nm ($A_{3\tau}$)

Προσδιορισμός

Για τους υπολογισμούς οι απορροφήσεις του τυφλού αφαιρούνται από τις απορροφήσεις του δείγματος.

Για να υπολογίσουμε την ποσότητα της γλυκόζης και φρουκτόζης πρέπει να χρησιμοποιήσουμε τον παρακάτω τύπο:

$$C = V \times MW \varepsilon \times d \times v \times 1000 \times \Delta A \text{ g/L} \quad (1)$$

N - τελικός όγκος (mL)

v - όγκος δείγματος (mL)

MW - μοριακό βάρος γλυκόζης (φρουκτόζης) (g/mol)

ε - συντελεστής απορρόφησης του NADPH, 340nm = 6,3 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d - πάχος κυψελίδας (cm)

ΔA - διαφορά απορρόφησης δείγματος – τυφλού

Για γλυκόζη

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1) - (A_{2\tau} - df \times A_{1\tau})$$

Όπου df είναι ο συντελεστής αραίωσης και ισούται με 0,808

Άρα η συγκέντρωση γλυκόζης ισούται με

$$C = (2600 \times 180,16 \times \Delta A) / (6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000)$$

$$C \text{ γλυκόζης [g/L]} = 0,744 \times \Delta A$$

Για φρουκτόζη

$$\Delta A = (A_{3-df} \times A_2) - (A_{3\tau} - df \times A_{2\tau})$$

Όπου df είναι ο συντελεστής αραίωσης και ισούται με 0,839

Άρα η συγκέντρωση φρουκτόζης ισούται με

$$C = (3.100 \times 180,16 \times \Delta A) / (6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000)$$

$$C \text{ φρουκτόζης [g/L]} = 0,877 \times \Delta A$$

4.3. Μικρό-οινοποιήσεις μικρού όγκου (1L)

Με στόχο την πιο βαθιά και λεπτομερή μελέτη των χαρακτηριστικών των πιο ενδιαφερουσών ζυμών επιλέχθηκαν τα 4 στελέχη με τα πιο επιθυμητά χαρακτηριστικά και υλοποιήθηκαν ζυμώσεις μεγαλύτερου όγκου (1L) ώστε να μελετηθούν πέρα από την ζυμωτική ικανότητα οι βασικοί οινολογικοί παράμετροι και το πρωτογενές αρωματικό προφίλ. Τα κριτήρια επιλογής ήταν η ικανότητα ζύμωσης, ο χρόνος που απαιτήθηκε μέχρι την αποζύμωση και στα δύο προηγούμενα στάδια αλλά και ο αρωματικός χαρακτήρας των οίνων που παρήχθησαν.

Η τελική ζύμωση λοιπόν, πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες 20° C σε μεγάλα γυάλινα μπουκάλια ανθεκτικά στην πίεση. Μοιράστηκαν λοιπόν 8L παστεριωμένου μούστου (72°C, 10 min) στις φιάλες (1L η κάθε μια). Οι ενέργειες προετοιμάστηκαν όπως σχολιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο, και 10⁶ κύτταρα κάθε στελέχους εμβολιάστηκαν ανάλογα με τον όγκο και την οπτική πυκνότητα. Στο τέλος των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε απολάσπωση και ψύξη σε θερμοκρασία περίπου 4°C για 2-3 μέρες έως ότου τα δείγματα αυτά χρησιμοποιηθούν για τις χημικές αναλύσεις που ακολουθούν αλλά και για οργανοληπτική αξιολόγηση.

4.3.1. Μέτρηση κατανάλωσης ολικών σακχάρων

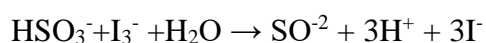
Η μέτρηση των σακχάρων έγινε μέσω του μηχανήματος Hyperlab smart της εταιρίας Steroglass και του kit Glucose and Fructose for Hyperlab.



Εικόνα 4: Αναλυτής Hyperlab όπου πραγματοποιήθηκαν οι τελικές μετρήσεις σακχάρων των στελεχών.

4.3.2. Διοξείδιο του θείου

Ο προσδιορισμός του θειώδους ανυδρίτη βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του θείου με το ιώδιο, δηλαδή:



Το περιβάλλον που πρέπει να πραγματοποιηθεί η αντίδραση θα πρέπει να είναι ισχυρά όξινο ειδικά το SO_2 αντιδρά με σάκχαρα, πολυφαινόλες και άλλους παράγοντες αναγωγής. Με την εμφάνιση του μπλε χρώματος καταλαβαίνουμε ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί και έτσι προσδιορίζεται το ελεύθερο SO_2 . Αν το pH μεταβληθεί σε ισχυρά αλκαλικό με προσθήκη KOH αποδεσμεύεται το θειώδες από τις ενώσεις του και έτσι προσδιορίζουμε την δεσμευμένη μορφή.

Τρόπος προσδιορισμού ελεύθερου θειώδους

Σε μια κωνική φιάλη 250mL προσθέτουμε 50mL δείγματος (οίνος – γλεύκος) και 5mL θειικό οξύ (H_2SO_4) 25%. Στην συνέχεια προσθέτουμε 5mL διαλύματος αμύλου που χρησιμοποιείται ως δείκτης στο τέλος της εξουδετέρωσης. Τιτλοδοτούμε με πρότυπο

διάλυμα ιωδίου 0,02N έως ότου παρατηρήσουμε μπλε απόχρωση και αυτή να παραμείνει για 20-30 sec. Σημειώνουμε την κατανάλωση σε mL του I₂ που καταναλώθηκε. Έστω A η κατανάλωση.

Τρόπος προσδιορισμού ολικού θειώδους

Μεταφέρουμε 50mL δείγματος και 12,5mL διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (KOH) 1N σε κωνική φιάλη 250mL. Ανακινούμε και περιμένουμε 10 λεπτά έως ότου πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Έπειτα προσθέτουμε 10 mL θειικό οξύ (H₂SO₄) 25% και 5mL δείκτη αμύλου και ανακατεύουμε. Τιτλοδοτούμε με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0,02N έως ότου παρατηρήσουμε μπλε απόχρωση και αυτή να παραμείνει για 20-30 sec. Σημειώνουμε την κατανάλωση σε mL του I₂ που καταναλώθηκε. Έστω B η κατανάλωση.

Υπολογίζουμε το θειώδες μέσω των παρακάτω τύπων:

Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης = $12,8 \times A$ σε mg SO₂/ L.

Ολικός θειώδης ανυδρίτης = $12,8 \times B$ σε mg SO₂ / L.

Δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης = Ολικός-ελεύθερος σε mg SO₂/ L .

4.3.3. Αφομοιώσιμο Άζωτο

Οι τιμές του αφομοιώσιμου αζώτου προσδιορίζονται πριν και μετά την ζύμωση με την μέθοδο της φορμόλης. Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση της ελεύθερης αμινομάδας των αμινοξέων με την μυρμηκική αλδεΰδη (φορμόλη). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 100mL μούστου και με την βοήθεια ενός πεχάμετρου ρυθμίζουμε το pH σε 8 με χρήση καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 1N. Ανακινούμε και φιλτράρουμε το δείγμα και προσθέτουμε 25mL φορμόλης (HCH=O) και αναμένουμε 1-2 λεπτά. Τοποθετούμε το δείγμα σε κωνική φιάλη και με χρήση προχοΐδας και πεχάμετρου τιτλοδοτούμε με πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1N μέχρι το pH να επανέλθει στο 8. Σημειώνουμε πόσα mL NaOH καταναλώθηκαν και υπολογίζουμε το ολικό αφομοιώσιμο άζωτο μέσω του τύπου:

αφομοιώσιμο άζωτο = $a \text{ mL} \times 28$ εκφραζόμενο σε mg/L, όπου :

a = ml καυστικού Νατρίου 0,1 N που καταναλώθηκαν .

4.3.4. Αιθυλική Αλκοόλη

Προσδιορίσαμε την αλκοόλη με δυο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος και ο πιο συνηθισμένος είναι με απόσταξη και έχει ως εξής:

Τοποθετούμε 200mL οίνου σε γυάλινη σφαιρική φιάλη και την συνδέουμε σε αποστακτική στήλη. Λόγω ύπαρξης πτητικών οξέων κάνουμε προσθήκη 10-12mL γάλακτος ασβεστίου για την εξουδετέρωση τους. Τοποθετούμε και κόκκους ελαφρόπετρας έτσι ώστε το δείγμα μας να μην αφρίζει. Σε μια άλλη ογκομετρική φιάλη προσθέτουμε ελάχιστα mL νερού (για την αποφυγή εξάτμισης) και την τοποθετούμε στην έξοδο της αποστακτικής. Θερμαίνουμε ήπια και συλλέγουμε το παραγόμενο απόσταγμα. Όταν φτάσουμε στο 75% της αρχικής ποσότητας, σταματάμε την απόσταξη. Ψύχουμε το δείγμα σε θερμοκρασία περίπου όσο ήταν το αρχικό δείγμα μας και συμπληρώνουμε αποσταγμένο νερό μέχρι τα 200mL. Γίνεται ανάδευση του μίγματος και μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο. Με χρήση αλκοολόμετρου και θερμομέτρου μετράμε την αλκοομετρική ένδειξη και ανάλογα με την θερμοκρασία του δείγματος μεταβαίνουμε σε απαραίτητες διορθώσεις (αποδεκτή διεθνής θερμοκρασία : 20°C) .

4.3.5. Ολική οξύτητα

Ο προσδιορισμός της γίνεται με ογκομέτρηση και η τεχνική βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος του δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης, όταν το pH του οίνου μετά από την προσθήκη NaOH φτάνει κοντά στην τιμή 10. Ο προσδιορισμός γίνεται ως εξής:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 30 mL αποσταγμένου νερού και 1 mL δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης και 5mL του δείγματός μας. Αν το δείγμα βρίσκεται σε ζύμωση αφαιρούμε το διοξείδιο του άνθρακα. Ανακατεύουμε και τιτλοδοτούμε σε κωνική φιάλη με καυστικό νάτριο NaOH N/10 μέχρι να εμφανιστεί κυανοπράσινη απόχρωση για 10-20 sec. Έστω K τα mL του NaOH που καταναλώθηκαν.

Ολική οξύτητα= $K/v \times N \times 1000$ σε meq/L

V= mL δείγματος που χρησιμοποιήσαμε

N= η κανονικότητα του καυστικού νατρίου

4.3.6. Οξικό Οξύ

Ο προσδιορισμός του οξικού οξέος γίνεται μέσω του KIT: ACETIC ACID AUTO και πραγματοποιείται και αυτός στον αναλυτή Hyperlab smart. Η μέθοδος βασίζεται στην μετατροπή του οξικού οξέος σε ακετυλο-συνένζυμο Α με την βοήθεια του ενζύμου Acetyl-coA-Synthetase (ACS). Το ακετυλο-συνένζυμο Α έπειτα αντιδρά με το οξαλικό οξύ με την παρουσία του ενζύμου Citrate Synthase (CS) για να δώσει κιτρικό οξύ.

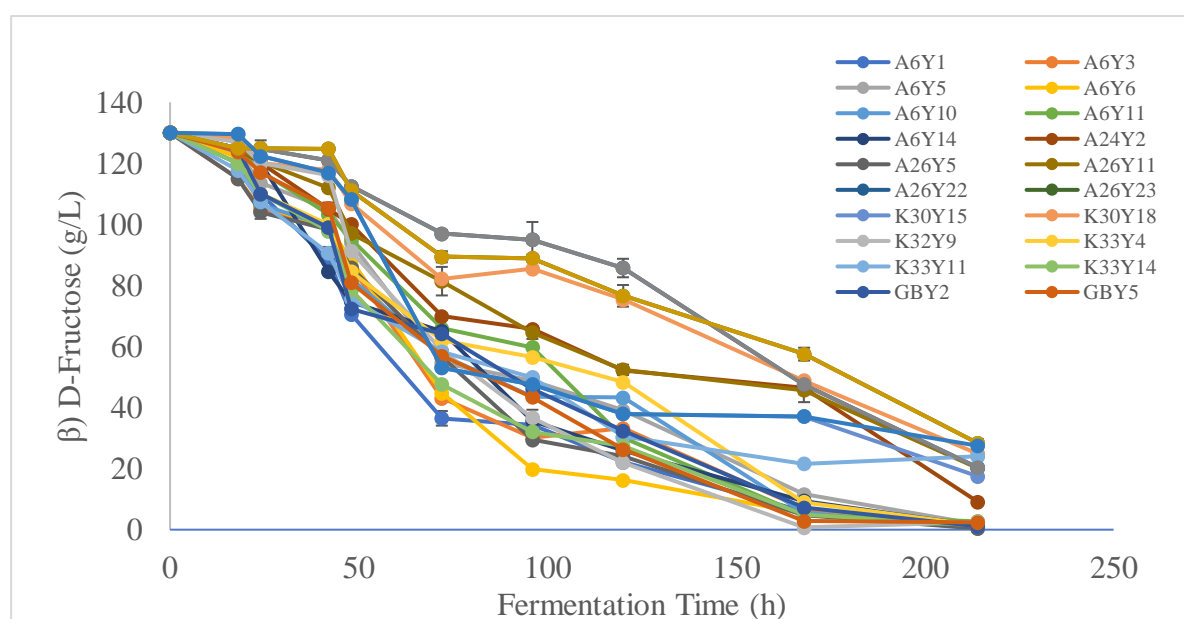
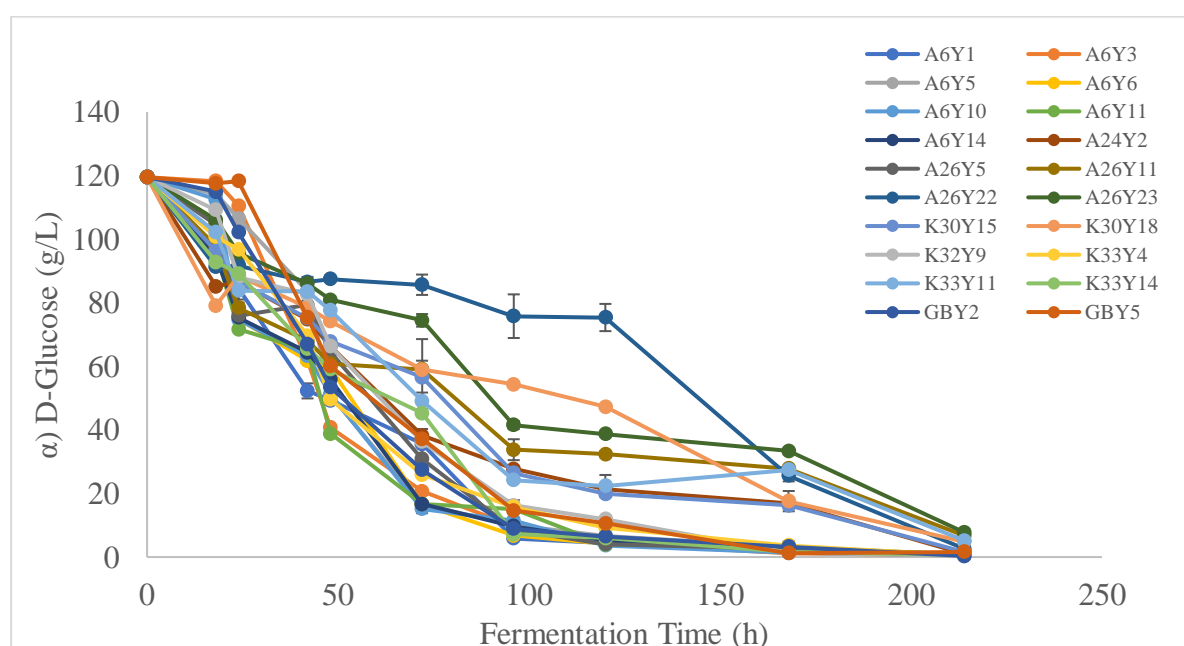
4.3.7. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Οι τέσσερις παραγόμενοι οίνοι πέρασαν και από μια οργανοληπτική αξιολόγηση από 8 εκπαιδευμένους δοκιμαστές με χρήση ελεύθερης κλίμακας. Σκοπός της οργανοληπτικής αξιολόγησης από 8 άτομα με διαφορετική εμπειρία στην αξιολόγηση οίνου ήταν η κατηγοριοποίηση των αρωμάτων τους αλλά και η αξιολόγησή τους βάση της προσωπικής εκτίμησης.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Μικρο-οινοποιήσεις 20 γηγενών στελεχών *S. cerevisiae* Αξιολόγηση ζυμοτικής ικανότητας των 20 στελεχών ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* (18 °C)

Κατά την ζύμωση μούστου Ασύρτικου Νεμέας με χρήση των 20 διαφορετικών στελεχών *S. cerevisiae*, λαμβανόταν καθημερινά δείγμα και προσδιοριζόταν η συγκέντρωση D-γλυκόζης και D-φρουκτόζης. Από τις μετρήσεις προέκυψαν τα ακόλουθα γραφήματα (Γράφημα 1α & 1β).



Διάγραμμα 1: Καμπύλες κατανάλωσης α) D-Γλυκόζης και β) D- Φρουκτόζης από τα στελέχη ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* που εξετάστηκαν. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Ακολουθεί ο πίνακας με τις αρχικές και τελικές τιμές των στελεχών.

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις D-γλυκόζης και D-φρουκτόζης στον μούστο και στο τελικό σημείο της ζύμωσης (214h).

	Γλυκόζη (g/L)	Φρουκτόζη (g/L)
ΜΟΥΣΤΟΣ	119,49 ± 0,90	130,00 ± 1,10
A6Y1	0,57 ± 0,17	1,29 ± 0,11
A6Y3	0,53 ± 0,01	1,29 ± 0,24
A6Y5	0,65 ± 0,00	1,74 ± 0,27
A6Y6	0,74 ± 0,03	1,59 ± 0,57
A6Y10	0,53 ± 0,29	0,36 ± 0,21
A6Y11	0,75 ± 0,32	2,70 ± 0,00
A6Y14	0,50 ± 0,23	1,31 ± 0,40
A24Y2	1,02 ± 0,71	9,12 ± 0,55
A26Y5	0,51 ± 0,48	0,39 ± 0,26
A26Y11	6,72 ± 1,33	20,14 ± 0,04
A26Y22	2,59 ± 0,16	20,36 ± 0,12
A26Y23	7,74 ± 0,88	28,34 ± 1,39
K30Y15	1,59 ± 0,39	17,49 ± 0,12
K30Y18	4,81 ± 0,58	24,88 ± 3,23
K32Y9	0,39 ± 0,53	2,44 ± 0,58
K33Y4	0,49 ± 0,29	1,40 ± 0,20
K33Y11	5,18 ± 0,02	23,97 ± 0,77
K33Y14	0,66 ± 0,22	1,32 ± 0,13
GBY2	0,35 ± 0,20	1,09 ± 0,09
GBY5	1,59 ± 0,22	2,40 ± 0,44

Όπως παρατηρούμε από το παραπάνω Διάγραμμα 1 και τον Πίνακα 2, τα 20 διαφορετικά γηγενή στελέχη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε μικροζυμώσεις παστεριωμένου μούστου στην ίδια θερμοκρασία (18° C) διαφέρουν ως προς τις καμπύλες κατανάλωσης σακχάρων. Συμπερασματικά από τα

διαγράμματα γλυκόζης – φρουκτόζης αλλά και από τον Πίνακα 2 μπορούμε να ταξινομήσουμε τις 20 διαφορετικές ζυμώσεις σε 3 κατηγορίες ως προς την γλυκόζη και την φρουκτόζη ξεχωριστά.

Βάσει τις καμπύλες καταβολισμού της γλυκόζης κατατάσσουμε στην πρώτη κατηγορία τα στελέχη που πραγματοποίησαν φυσιολογικές και ομαλές αλκοολικές ζυμώσεις. Τα στελέχη αυτά είναι : το A6Y1, A6Y3, A6Y5, A6Y6, A6Y10, A6Y14, A26Y5, K32Y9, K33Y4, K33Y14, GBY2. Σε όλες αυτές τις ζυμώσεις δεν παρουσιάστηκαν δυσκολίες κατά την διάρκεια της ζύμωσης και επετεύχθη και πλήρης αποζύμωση της γλυκόζης με συγκεντρώσεις μικρότερες από 1 g/L, στον επιθυμητό στόχο που είχε τεθεί.

Στην δεύτερη κατηγορία κατατάσσουμε τα στελέχη που παρουσίασαν μικρές δυσκολίες κατά την διάρκεια της ζύμωσης (πχ. Διακοπή κατανάλωσης γλυκόζης σε ορισμένα χρονικά σημεία της ζύμωσης και σε μερικά από αυτά όχι πλήρης αποζύμωση της γλυκόζης με συγκεντρώσεις λίγο μεγαλύτερες από το 1 g/L). Τα στελέχη που υπάγονται σε αυτήν την κατηγορία είναι τα εξής: A6Y11, A24Y2, K30Y15, GBY5.

Η τρίτη κατηγορία αποτελείται από τα στελέχη που πραγματοποίησαν προβληματικές και μη υποδειγματικές ζυμώσεις. Τα κριτήρια που τα κατατάσσουν σε αυτήν την κατηγορία είναι η γενικότερη δύσκολη πορεία ζύμωσης, όπου η κατανάλωση γλυκόζης σταμάταγε σε ορισμένα σημεία , που σημαίνει ότι η ζύμη δεν κατανάλωνε σάκχαρα για να παράγει αλκοόλη, αλλά και ότι η ζύμωση σε κανένα από αυτά τα στελέχη δεν τελείωνε στον επιθυμητό χρόνο. Όλα τα στελέχη είχαν συγκέντρωση γλυκόζης αρκετά μεγαλύτερη από 1 g/L. Εδώ εντάσσονται τα στελέχη: A26Y11, A26Y22, A26Y23, K30Y18, και K33Y11.

Αντίστοιχα βάσει τις καμπύλες καταβολισμού της φρουκτόζης,

στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται τα στελέχη : A6Y1, A6Y3, A6Y5, A6Y6, A6Y10, A6Y14, A26Y5, K33Y4, K33Y14 και GBY2. Τα στελέχη αυτά πραγματοποίησαν ικανοποιητικές ζυμώσεις και οι τελικές αποζυμώσεις φρουκτόζης βρίσκονται σε συγκεντρώσεις κάτω από 2 g/L (θεωρούμε ότι αποζύμωσαν σε αυτές τις συγκεντρώσεις επειδή είχαμε υψηλότερη αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης έναντι γλυκόζης).

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα στελέχη: A6Y11, K32Y9 και GBY5. Εδώ οι τελικές τιμές γλυκόζης ανέρχονται λίγο πιο πάνω από 2 g/L και στην τρίτη και

τελευταία κατηγορία με τις μη υποδειγματικές ζυμώσεις εντάσσονται τα στελέχη: A24Y2, A26Y11, A26Y22, A26Y23, K30Y15, K30Y18 και το K33Y11. Εδώ παρατηρείται ότι εκτός τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά την διάρκεια των ζυμώσεων, πολλές από τις τελικές τιμές φρουκτόζης άγγιζαν και ξεπερνούσαν τα 20 g/L γεγονός που μας δείχνει ότι τα στελέχη δεν μπορούσαν να αποζυμώσουν.

Παρατηρώντας συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και την κατηγοριοποίηση των στελεχών στις τρεις κατηγορίες στην γλυκόζη αλλά και στην φρουκτόζη, τα στελέχη που πραγματοποίησαν ιδανικές για το πείραμα αλκοολικές ζυμώσεις είναι τα: A6Y1, A6Y3, A6Y5, A6Y6, A6Y10, A6Y14, A26Y5, K33Y4, K33Y14 και το GBY2. Από την άλλη μεριά τα στελέχη που δεν ικανοποίησαν τόσο με τις ζυμώσεις τους όσο και με τις τελικές συγκεντρώσεις σακχάρων τους είναι τα : A26Y11, A26Y22, A26Y23, K30Y15, K30Y18 και το K33Y11. Τα υπολειπόμενα δείγματα (A6Y11, A24Y2, K32Y9 και το GBY5) βρίσκονται στο μεταίχμιο των δύο παραπάνω κατηγοριών με την βαρύτητα να δείχνει την δεύτερη κατηγορία.

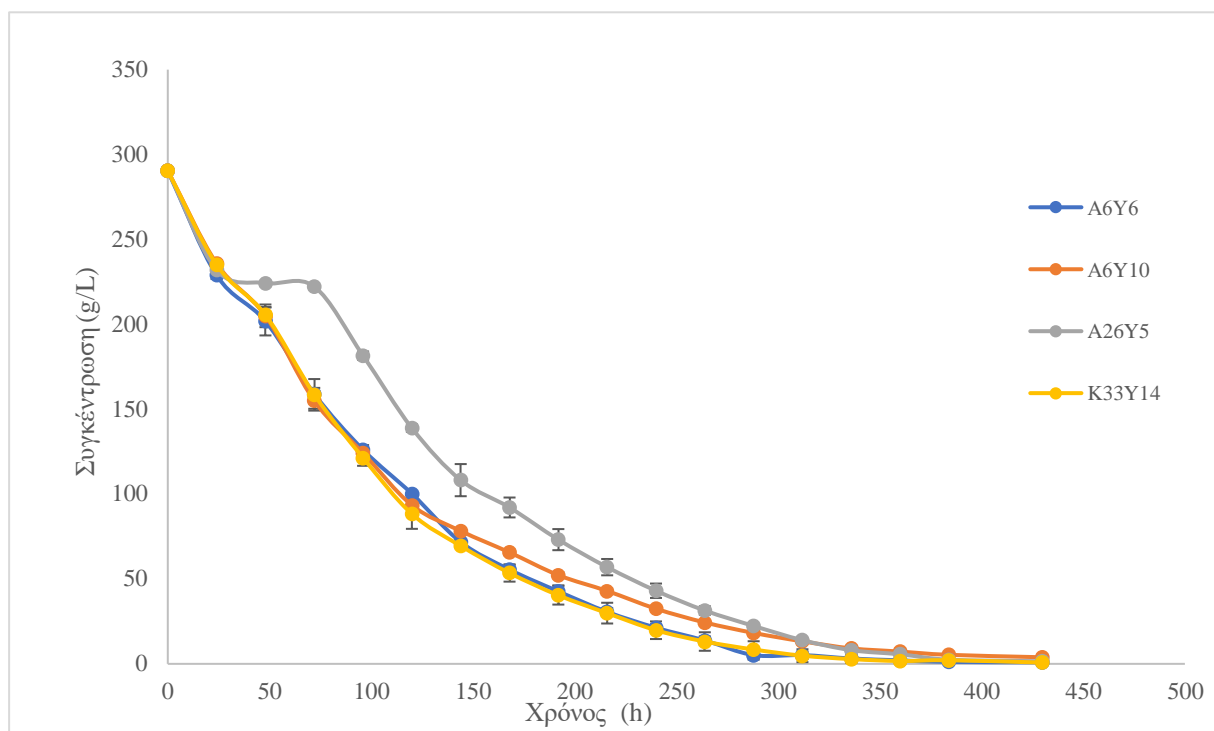
Τα στελέχη λοιπόν που εντάσσονται στην τρίτη κατηγορία απορρίπτονται από την επιλογή διότι πραγματοποίησαν μη ιδανικές αλκοολικές ζυμώσεις και δεν κατάφεραν να περατώσουν την ζύμωση. Επίσης τα στελέχη της δεύτερης κατηγορίας δεν θα επιλεγθούν διότι παρουσίασαν μικρά προβλήματα είτε κατά την πορεία της ζύμωσης είτε δεν αποζύμωσαν. Εν τέλει η επιλογή έγινε από την πρώτη κατηγορία, όπου είχαμε ιδανικές για το πείραμα ζυμώσεις και επετεύχθη και αποζύμωση των σακχάρων. Στην τελική επιλογή των τεσσάρων συνέβαλε μια άτυπη οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων οσφρητικά, όπου μετά το πέρας της, επιλέχθηκαν τα A6Y6, A6Y10, A26Y5 και K33Y14. Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν τα πλέον επιθυμητά αρώματα και γεύση και όπου ήταν καθοριστικά στην λήψη της τελικής απόφασης.

Στην τελική επιλογή των τεσσάρων στελεχών για τις μικρο-οινοποιήσεις μικρού όγκου, σημαντικό ρόλο έπαιξαν τα παραπάνω δεδομένα

5.2. Μικρο-οινοποιήσεις επιλεγμένων στελεχών *S. cerevisiae*

5.2.1. Μέτρηση κατανάλωσης ολικών σακχάρων

Τα επιλεγμένα 4 στελέχη *S. cerevisiae* εμβολιάστηκαν σε παστεριωμένο γλεύκος Ασύρτικου σε εργαστηριακή κλίμακα μεγαλύτερου όγκου (1L). Τα αποτελέσματα της κατανάλωσης των σακχάρων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2 : Καμπύλες κατανάλωσης ολικών σακχάρων από τα στελέχη ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* που εξετάστηκαν. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων μετρήσεων

Παρατίθενται επίσης οι αρχικές και οι τελικές τιμές ολικών σακχάρων των τεσσάρων επιλεγμένων στελεχών στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 3: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των τεσσάρων στελεχών. Οι τιμές αναφέρονται σε g/L, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους.

	0	480
A6Y6	290,47 ± 0,00	0,91 ± 0,63
A6Y10	290,47 ± 0,00	1,34 ± 0,09
A26Y5	290,47 ± 0,00	1,51 ± 0,65
K33Y14	290,47 ± 0,00	0,74 ± 0,88

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 2 αλλά και τον Πίνακα 3, παρατηρούμε ότι και τα τέσσερα στελέχη *S. cerevisiae* πραγματοποίησαν φυσιολογικές και ομαλές ζυμώσεις. Η συνολική διάρκεια των ζυμώσεων ανέρχεται στις 20 ημέρες. Τα στελέχη αποζύμωσαν πλήρως με τελικές συγκεντρώσεις σακχάρων μικρότερες του 1,51 g/L που

είχε το στέλεχος A26Y5, με την μικρότερη συγκέντρωση να έχει το στέλεχος K33Y14 με 0,74 g/L. Οι οίνοι αυτοί κατατάσσονται στην κατηγορία των ξηρών οίνων. Μια παρατήρηση ακόμα είναι ότι το στέλεχος A26Y5 παρουσίασε ένα κώλυμα κατά την δεύτερη με τρίτη μέρα ζύμωσης που όμως δεν παρεμπόδισε την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης με $1,51 \pm 0,65$ τελικά ολικά σάκχαρα.

4.2.2 Αποτελέσματα βασικών οινολογικών αναλύσεων

Οι τέσσερις οίνοι που παράχθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, αναλύθηκαν μετέπειτα και σε χημικό βαθμό. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν : η ολική οξύτητα τους, το pH, το ολικό θειώδες (ελεύθερο και δεσμευμένο), το αφομοιώσιμο άζωτο, η συγκέντρωση σε αιθανόλη και οι συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα των εν λόγω χημικών αναλύσεων

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα των οινολογικών αναλύσεων στους παραγόμενους οίνους με χρήση των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*. Κάθε ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και αναφέρεται η μέση τιμή των αναλύσεων \pm τυπική απόκλιση.

	Αλκοόλη	Οξύτητα		Αφομοιώσιμο Άζωτο (YAN)*	Θειώδες (mg SO ₂ /L)			
		pH	Ολική		Πτητική*	Ολικό*	Ελεύθερο*	Δεσμευμένο*
% vol	g/L τρυγικού οξέος		g/L οξικού οξέος	mg N ₂ /L				
Γλεύκος		3,2 \pm 0,00	5,77 \pm 0,00		609,0 \pm 0,00	16,6 \pm 0,00	5,1 \pm 0,00	11,5 \pm 0,00
A6Y6	13,5	3,19 \pm 0,01 ^a	5,48 \pm 0,11 ^a	0,26 \pm 0,03 ^a	303,1 \pm 0,99 ^a	13,1 \pm 0,45 ^a	3,5 \pm 0,45 ^a	9,6 \pm 0,00 ^a
A6Y10	13,7	3,2 \pm 0,01 ^a	5,38 \pm 0,03 ^a	0,28 \pm 0,06 ^a	318,5 \pm 12,87 ^b	12,8 \pm 0,91 ^a	3,7 \pm 0,23 ^a	9,1 \pm 0,91 ^a
A26Y5	13,8	3,18 \pm 0,01 ^a	5,44 \pm 0,16 ^a	0,27 \pm 0,01 ^a	290,5 \pm 0,99 ^a	8,6 \pm 0,45 ^b	5,8 \pm 0,00 ^b	2,9 \pm 0,45 ^b
K33Y14	13,6	3,2 \pm 0,01 ^a	5,68 \pm 0,13 ^a	0,4 \pm 0,01 ^b	317,8 \pm 3,96 ^b	13,8 \pm 1,36 ^a	6,4 \pm 0,91 ^b	7,4 \pm 0,45 ^c

Πίνακας 5: Σύγκριση απόδοσης σε αιθανόλη από τα στελέχη που εξετάστηκαν

	Χρόνος ζύμωσης(h)	Αιθανόλη EtOH (g/L)	Ολικά σάκχαρα (g/L)	Ολικά Σάκχαρα που καταναλώθηκαν (TSc)	Απόδοση σε αιθανόλη (Yield EtOH/TSc)
A6Y6	430	106,6	0,9 ±0,6	239,4 ±0,6	0,445
A6Y10	430	108,13	1,34 ±0,87	238,9 ±0,87	0,452
AΣ6Y5	430	108,92	1,5 ±0,65	238,7 ±0,65	0,456
K33Y14	430	107,34	0,7 ±0,65	239,5 ±0,65	0,448

Από τα δεδομένα του Πίνακα χ καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

Παρατηρούμε ότι η **Ολική Οξύτητα** των δειγμάτων μας κυμαίνεται από 5,3-5,7 g/L τρυγικού οξέος. Η αρχική οξύτητα του οίνου σημειώνεται ότι είναι 5,77 g/L τρυγικού οξέος, ενώ σε όλα μας τα τελικά δείγματα η οξύτητα είναι χαμηλότερη από εκείνη του γλεύκος. Τα δείγματα A6Y6 και A26Y5 έχουν σχεδόν ίδια τιμή οξύτητας με 5,48 g/L και 5,44 g/L αντίστοιχα. Την μεγαλύτερη τιμή την έχει το δείγμα K33Y14 με 5,68 g/L και την μικρότερη τιμή την βλέπουμε στο δείγμα A6Y10. Η μείωση του τρυγικού οξέος είναι λογική σύμφωνα με την βιβλιογραφία, διότι έχουμε αύξηση της αλκοόλης άρα και μείωση της διαλυτότητας (Sainz et al., 2022). Επίσης επηρεάζεται από την θερμοκρασία της ζύμωσης όπου υπάρχει καθίζηση τρυγικών αλάτων (Fernando Goncalves et al., 2003)

Οι τιμές **pH** των δειγμάτων μας παρατηρούμε ότι βρίσκονται γύρω στο 3,2. Δεν παρατηρούμε μεγάλη διαφοροποίηση στις τιμές του pH αφού και η μέγιστη διαφορά ανέρχεται στις 0,2 μονάδες. Με βάση την βιβλιογραφία, το pH σε οίνους της ποικιλίας Ασύρτικου ποικίλλει μεταξύ 3,1-3,3 οπότε οι τιμές μας βρίσκονται μέσα στα αναμενόμενα πλαίσια.

Το ποσοστό **αλκοόλης** των δειγμάτων μας κυμαίνεται από 13,5-13,8% vol. Την μεγαλύτερη τιμή την έχει το δείγμα A26Y5 με 13,8% vol ενώ την μικρότερη τιμή το δείγμα A6Y6. Οι οίνοι αυτοί λοιπόν κατατάσσονται στην κατηγορία ‘υψηλής αλκοόλης αφού συνήθως ποσοστά πάνω από 13,5% vol ανήκουν στην κατηγορία αυτή. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ποικιλία Ασύρτικο παράγει οίνους με υψηλές τιμές αλκοόλης άρα συμπεραίνουμε ότι οι τιμές μας είναι λογικές.

Όσον αφορά το **οξικό οξύ**, οι συγκεντρώσεις τους στα δείγματα μας κυμαίνονται από 0,25 έως 0,30g/L με εξαίρεση το δείγμα K33Y14 όπου έχει συγκέντρωση 0,40 g/L. Αυτό μας δείχνει ότι διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* μπορούν να παράγουν διαφορετικές τιμές οξικού οξέος όπως έγινε σύγκριση και σε άλλη έρευνα με διαφορετικά στελέχη ζυμών (Zhang et al., 2021). Οι τιμές αυτές μας δείχνουν ότι παράχθηκαν οίνοι με φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης οξικού οξέος και συνεπώς οίνοι με χαμηλή πτητική οξύτητα. Επίσης υπάρχει χαμηλή επικινδυνότητα παραγωγής οίνων με δυσάρεστες οσμές και γεύσεις, καθώς οι τιμές απέχουν πολύ από τα επικίνδυνα όρια (0,7-0,8 g/L).

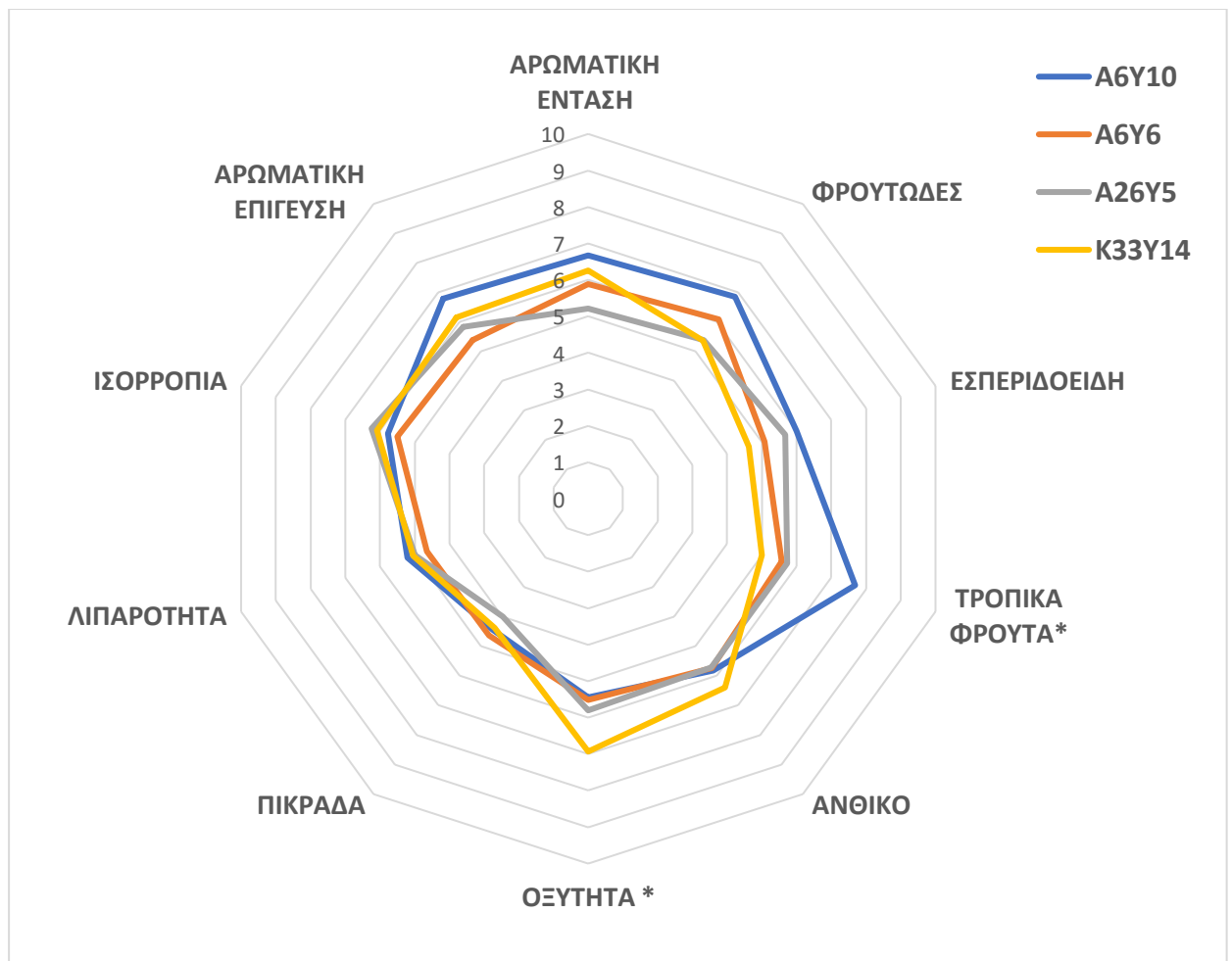
Στα πλαίσια της ανάλυσης του **αφομοιώσιμου αζώτου** απαιτείται ο υπολογισμός της κατανάλωσης που είχαν τα δείγματα μας κατά την διάρκεια της μικρό-οινοποίησης. Αυτή υπολογίζεται με αφαίρεση της εκάστοτε τιμής των δειγμάτων μας από την αρχική τιμή αζώτου του γλεύκους μας. Παρατηρούμε ότι και στα 4 δείγματα η κατανάλωση Αζώτου από τις ζύμες κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, δηλαδή από 290-310mg/L. Όπως αναφέρθηκε και στην θεωρία οι ζύμες μπορούν να καταναλώσουν έως και 400mg/L όποτε οι καταναλώσεις μας κυμαίνονται σε λογικά όρια. Επίσης κανένα από τα δείγματα μας δεν κινδυνεύει να εμφανίσει ανεπιθύμητες οσμές αφού δεν υπήρχε κατανάλωση μικρότερη από 140mg/L.

Παρατηρώντας τις τιμές του **θειώδους (SO₂)** οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι σε όλα τα δείγματα μετά την οινοποίηση βρίσκουμε μεγαλύτερη συγκέντρωση δεσμευμένου θειώδους παρά ελεύθερου, πράγμα που σημαίνει ότι η μεγαλύτερη ποσότητα δεσμεύτηκε για την δημιουργία διαφόρων ενώσεων. Επίσης οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου θειώδους κυμαίνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, έτσι υπάρχει πολύ χαμηλός κίνδυνος εμφάνισης ανεπιθύμητων οσμών και γενικότερα αλλοιώσεων. Ακόμα μια παρατήρηση είναι ότι η τιμή του ολικού θειώδους του γλεύκους είναι 16,64mg/L. Παρατηρούμε ότι οι τιμές ολικού θειώδους είναι διαφορετικές το οποίο συμφωνεί με την θεωρία, ότι κάθε ένα διαφορετικό είδος ζύμης παράγει διαφορετική ποσότητα θειώδους. Αντίστοιχα και σε αυτό το πείραμα (Dimoroulou et al., 2020) παρατηρούμε ότι στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικά στελέχη ζυμών παράχθηκαν διαφορετικές τιμές ολικού θειώδους. Το δείγμα με την μεγαλύτερη παραγωγή ολικού θειώδους ήταν το K33Y14 με 13,76 mg/L. Έπειτα πολύ κοντά στην τιμή αυτή βρίσκεται το στέλεχος A6Y6 με 13,12 mg/L. Ακολουθεί το A6Y10 με 12,8 mg/L και την μικρότερη τιμή κατείχε το στέλεχος A26Y5

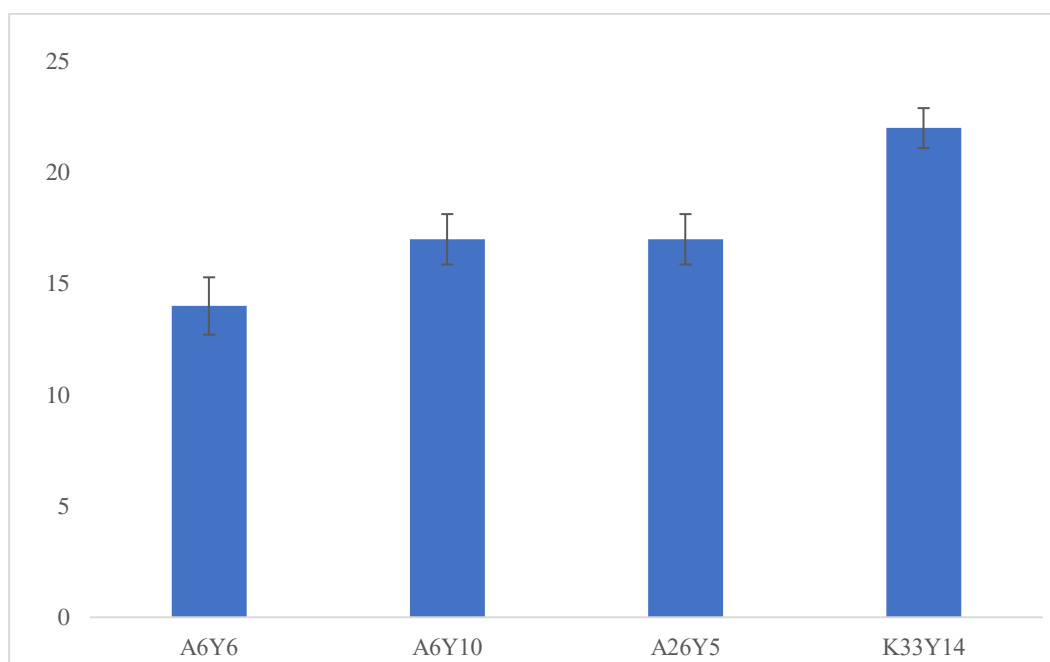
με 8,64 mg/L όπου διαφέρει κατά πολύ από τα υπόλοιπα στελέχη. Αν αναλύσουμε τις τιμές θειώδους βρίσκουμε ότι όσον αφορά το ελεύθερο SO₂ την μεγαλύτερη τιμή την έχει επίσης το στέλεχος K33Y14 με τιμή 6,4 mg/L. Το αμέσως επόμενο στέλεχος είναι το A26Y5 με 5,76 mg/L. Πολύ κοντά σε τιμές βρίσκονται τα δύο τελευταία στελέχη, το A6Y10 και το A6Y6 με τιμές 3,84 mg/L και 3,52 mg/L αντίστοιχα. Εξετάζοντας και τις τιμές του δεσμευμένου θειώδους, την μεγαλύτερη τιμή την έχει το στέλεχος A6Y6 με 9,6 mg/L ακολουθεί το A6Y10 με 8,96 mg/L. Έπειτα ακολουθεί το στέλεχος K33Y14 με τιμή 7,36 mg/L και στην τελευταία θέση όπως ήταν αναμενόμενο βρίσκουμε το στέλεχος A26Y5 με 2,88 mg/L. Μετά την μικρό-οινοποίηση όμως παρατηρούμε ότι όλα μας τα δείγματα έχουν χαμηλότερες τιμές θειώδους συγκριτικά με το αρχικό μας γλεύκος. Αυτό συμβαίνει διότι οι ζύμες έχουν την τάση να καταναλώνουν θειώδες κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Margalit et al., 2016). Έτσι το στέλεχος A26Y5 θα μπορούσε κανείς να πει ότι ήταν αυτό που είχε την ανάγκη να καταναλώσει περισσότερο θειώδες.

4.2.3. Αποτελέσματα ανάλυσης αρωματικού προφίλ

Οι τέσσερις παραγόμενοι οίνοι πέρασαν και από μια οργανοληπτική αξιολόγηση από 8 εκπαιδευμένους δοκιμαστές με χρήση ελεύθερης κλίμακας. Σκοπός της οργανοληπτικής αξιολόγησης από 8 άτομα με διαφορετική εμπειρία στην αξιολόγηση οίνου ήταν η κατηγοριοποίηση των αρωμάτων τους αλλά και η αξιολόγησή τους βάση της προσωπικής εκτίμησης. Σύμφωνα με τους δοκιμαστές σε κάθε δείγμα υπήρχε αισθητή διαφορά όσον αφορά τα αρώματα τους αλλά και την ποιότητά του. Οι συγκεκριμένες διαφορές οφείλονται στα στελέχη ζυμών αφού το αρχικό γλεύκος αλλά και οι συνθήκες ζυμώσεων ήταν ίδιες για όλα τα δείγματα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στα δύο παρακάτω διαγράμματα:



Διάγραμμα 3 : Συνολικό αρωματικό προφίλ των τεσσάρων στελεχών.



Διάγραμμα 4: Κατάταξη αρεσκείας των στελεχών από τους δοκιμαστές.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 3, στο στέλεχος **A6Y6** παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αρωματική ένταση και αρωματική επίγευση από τα υπόλοιπα δείγματα, τα αρώματα που κυριαρχούσαν ήταν κυρίως φρουτώδη και λιγότερο ανθικά τα με έμφαση στα τροπικά και τα εσπεριδοειδή. Ακόμη φαίνεται να είχε την μεγαλύτερη λιπαρότητα στο στόμα, μία μέτρια προς υψηλή οξύτητα στο στόμα, καλή ισορροπία και μέτρια πικράδα.

Όσον αφορά το στέλεχος **A6Y10** σύμφωνα με τις δοκιμαστές το δείγμα είχε μια μέτρια αρωματική ένταση και την κοντύτερη επίγευση, ξεχώριζαν τα φρουτώδες αρώματα και λιγότερο τα ανθικά, με περισσότερα τροπικά παρά εσπεριδοειδή. Στο στόμα φάνηκε να είχε την λιγότερη ισορροπία και λιπαρότητα και την μεγαλύτερη πικράδα και μια μέτρια οξύτητα.

Ο οίνος που προήλθε από εμβολιασμό με το στέλεχος **A26Y5** παρουσίασε την χαμηλότερη αρωματική ένταση, και μέτρια επίγευση. Στην μύτη παρατηρήθηκε μια ισορροπία αρωμάτων με εσπεριδοειδή, τροπικά αλλά και ανθικά. Το χαρακτήρισαν ως ένα κρασί με μέτρια οξύτητα και λιπαρότητα, την χαμηλότερη πικράδα και την μεγαλύτερη ισορροπία στο στόμα.

Τέλος για το κρασί που είχε ζυμώσει με το στέλεχος **K33Y14** έχουμε μια μέτρια προς υψηλή αρωματική ένταση και επίγευση, με περισσότερα ανθικά αρώματα, και τα λιγότερα φρουτώδη από τα άλλα δείγματα. Επίσης βλέπουμε την μεγαλύτερη οξύτητα, και μέτριες τιμές όσον αφορά την πικράδα την λιπαρότητα και την ισορροπία.

Στο διάγραμμά 4 παρατηρούμε την ολική αξιολόγηση των δοκιμαστών με βάση την προσωπική αρέσκεια τους. Το πιο αρεστό ήταν το κρασί με το στέλεχος K33Y14, έπειτα στην ίδια θέση είναι βρίσκονται τα δείγματα A6Y10 και A66Y5 και τέλος το λιγότερο αρεστό ήταν το δείγμα A6Y6. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στο αρωματικό προφίλ των οίνων φαίνεται να συναντάμε ως προς την οξύτητα αλλά και ως προς τα τροπικά αρώματα. Αυτό φαίνεται και στον πίνακα 6 που παρατίθεται παρακάτω.

Πίνακας 6: Στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρωμάτων των στελεχών.

	P-VALUE	A6Y6	A6Y10	A26Y5	K33Y14
ΤΡΟΠΙΚΑ ΦΡΟΥΤΑ	0,0704	7,68a	5,57b	5,72ab	5b
ΟΞΥΤΗΤΑ	0,1242	5,44a	5,51a	5,8ab	6,92b

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, μετά το πέρας της παρούσα πτυχιακής εργασίας, αξιολογήθηκαν επιτυχώς γηγενείς ζύμες *S.cerevisiae* ως προς την ζυμωτική τους ικανότητα, τον χημικό αλλά και αρωματικό τους χαρακτήρα. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν μπορούν να χαρακτηριστούν ως απαραίτητες για την πληρέστερη και ορθότερη αξιολόγηση στελεχών ζυμομυκήτων, και συγκεκριμένα στο εν λόγω πείραμα γηγενών ζυμών *S.cerevisiae*, όπου είχαν πραγματοποιήσει προηγουμένως αλκοολικές ζυμώσεις. Η αξιολόγηση των συγκεκριμένων ζυμών θεωρείται διαφορετική από την συνηθισμένη προσέγγιση των περισσότερων οινοπαραγωγών, οι οποίοι έχουν την τάση να επιλέγουν εμπορικές ζύμες για την πραγματοποίηση αλκοολικών ζυμώσεων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας, τα τέσσερα στελέχη παρουσίασαν μικρές διαφορές ως προς τις τρεις πτυχές που ερευνήθηκαν. Ως προς την ζυμωτική ικανότητα, τα στελέχη κυμάνθηκαν σε ίδια επίπεδα με παρόμοιες καμπύλες κατανάλωσης σακχάρων. Όλα τα στελέχη αποζύμωσαν πλήρως. Σχετικά με την ανάλυση των χημικών χαρακτηριστικών, μεγαλύτερες διαφορές παρατηρήθηκαν στο θειώδες. Αντίθετα, οι τιμές των υπόλοιπων χημικών χαρακτηριστικών παρουσίασαν ελάχιστες διαφορές. Τέλος, αναφορικά με την οργανοληπτική αξιολόγηση, καταγράφηκαν διαφορές στην ένταση του φρουτώδη χαρακτήρα αλλά και στην ολική οξύτητα. Ως εκ τούτου, τα τέσσερα στελέχη έχουν την τάση να παράγουν υψηλής ποιότητας οίνους.

Αν και όλα τα στελέχη παρουσίασαν παρόμοιο ποιοτικά προϊόν, ως καταλληλότερη επιλογή για έναρξη αλκοολικής ζύμωσης, θα ήταν το στέλεχος K33Y14. Η αρωματική ισορροπία, η ιδανική οξύτητα, τόσο γευστικά όσο και πρακτικά αλλά και η χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών σακχάρων (γεγονός που υποδεικνύει πλήρη αποζύμωση) αποτελούν καταλυτικό παράγοντα στην επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.2. Ξένη βιβλιογραφία

Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 215e224.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grapes berries. *International journal of food microbiology*, 153,243-259.

Belitz H, D., Grosch, W., Schieberle, P. (2006), *Food Chemistry*, 375- 382, 404-417, 657-683, 700, 742, 1456-1494.

Bisson, L.F. (2012). Geographic origin and diversity of Wine strains of *Saccharomyces*. *American journal of enology viticulture*, 63, 165-176.

Bisson, L.F. (2015) *The microbial dynamics of wine fermentation*, G.A. Walker University of California, Davis, CA, USA.

Blanco, P., Orriols, I., Losada, A. (2011). Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous Fermentation. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 38, 235-239.

Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M., Grieco, F., Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine.

Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, A., Simal-Gandara, J., (2020). Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods*, 10(1), 51.

Chen, K., Liu, C., Wang, Y., Wang, Z., Li, F., Ma, L., Jingming L. (2021) Predominance of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts in the traditional fermentation of greengage wine and their significant contribution to the evolution of terpenes and ethyl esters.

Chidi, S., Bauer, F., Rossouw, D. (2018). Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity - a review. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 39(2), 315–329.

Clavijo, A., Calderón, I., Paneque, P. (2010). Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*.

Delfini, C., Formica, F. (2001). *Wine microbiology Science and technology*.

Dimopoulou, M., Troianou, V., Toumpeki, C., Gosselin, Y., Dorignac, E., Kotseridis, Y. (2020). Effect of strains from different *Saccharomyces* species used in different inoculation schemes on chemical composition and sensory characteristics of Sauvignon blanc wine.

E. Mataix, M.D.L. Castro (1999) Sequential determination of total and volatile acidity in wines based on a flow injection-pervaporation approach.

Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Fracassetti, D., Cocolin, L. (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 257, 350–360.

García-Ríos, E., Guillamón, J. (2019). Sulfur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: beyond SSU1.

Gimenez-Gomez, P., Gutierrez-Capitan, M., Puig-Pujol, A., Capdevila, F., Munoz, S., Tobena, A. (2017). Analysis of free and total sulfur dioxide in wine by using a gas-diffusion analytical system with pH detection. *Food Chemistry*, 228, 518–525.

Gimenez-Gomez, P., Gutiérrez-Capitan, M., Manuel Ríos, J., Capdevila, F., Puig-Pujol, A., Jiménez-Jorquera, C. (2021). Microanalytical flow system for the simultaneous determination of acetic acid and free sulfur dioxide in wines.

Goncalves, F., Fernandes, C., Cameira, P., Norberta de Pinho, M. (2003). Wine tartaric stabilization by electro dialysis and its assessment by the saturation temperature.

Goold, H.D., Kroukamp, H., Williams, T.C., Paulsen, I.T Varela, C., Pretorius, I.S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbiology Biotechnology* 10(2), 264-278.

Helwi, P., Habran, A., Guillaumie, S., Thibon, C., Hilbert, G., Gomes, E., van Leeuwen, C. (2015). Vine Nitrogen Status Does Not Have a Direct Impact on 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Grape Berries and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), 9789–9802.

Howell, K.S., Cozzolino, D., Bartowsky, E., Fleet, G.H., Henschke, P.A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 6, 91e101.

Jemec, K., Raspor, P. (2005). Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite cultures dictates bioprocess kinetics. *Food Microbiol* 22:293–30

Killian and Ough. (1979). Fermentation Esters- Formation and Retention as affected by fermentation Temperature.

Lukić, I., Jedrejčić, N., Kovačević Ganić, K., Staver, M., Peršurić, Đ. (2015). Phenol and Aroma Composition of White Wines Produced by Prolonged Fermentative Maceration and Maturation in Wooden Barrels. *Food Technology and Biotechnology*.

- Margalit, Y., Crum, J. (1999). Concepts in wine chemistry.
- Martí-Raga, M., Sancho, M., Guillamon, J., Mas, A., Beltran, G. (2015). The effect of nitrogen addition on the fermentative performance during sparkling wine production. *Food Research International*, 67, 126–135.
- Robles, A., Fabjanowicz, M., Chmiel, T., Wasylka, J. (2019). Determination and identification of organic acids in wine samples. *Problems and challenges*.
- Ronald., S.J. (2014). Fermentation. *Wine science*, 427-524.
- Russo, P., Tufariello, M., Renna, R., Tristezza, M., Taurino, M., Palombi, L., Grieco, F. (2020). New Insights into the Oenological Significance of *Candida zemplinina*: Impact of Selected Autochthonous Strains on the Volatile Profile of Apulian Wines. *Microorganisms*, 8(5).
- Sainz, F., Pardo, J., Ruiz, A., Exposito, D., Armero, R., Querol, A., Guillamon, J. (2022). Use of non-conventional yeasts to increase total acidity in the Cava base wines.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starters commercial yeasts. *FEMS Yeast Research* 7, 317–329.
- Wedler, H., Pemberton, R., Tantillo, D. (2015). Carbocations and the Complex Flavor and Bouquet of Wine: Mechanistic Aspects of Terpene Biosynthesis in Wine Grapes. *Molecules*, 20(6), 10781–10792.
- Zhang, B., Ivanova-Petropulo, P., Duan, C., Yan, G. (2021). Distinctive chemical and aromatic composition of red wines produced by *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with indigenous and commercial non-*Saccharomyces* strains.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 197–203.

6.3. Ελληνική Βιβλιογραφία

Αργύρης Τσακίρης (2012) Οινογνωσία.

Αργύρης Τσακίρης (2017). Οινολογία.

Νικολάου Α.Ν (2012) Αμπελογραφία.

Ντουρτόγλου Βασίλειος (2018). Οινολογία. Βασικές αρχές & μέθοδοι οινοποίησης. Μεταφρασμένο βιβλίο των Roger B. Boulton, Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson & Ralph E. Kunkee.

Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος (2015). Οινολογία επιστήμη και τεχνολογία.

Τσέτουρας Λ. Παναγιώτης (2014). Η τέχνη της Αμπελουργίας. Αμπέλι οινοποιίας.

Τσέτουρας Λ. Παναγιώτης (2014). Τα μυστικά του καλού κρασιού.